

Einfluss des Geschlechts auf den Selenmetabolismus und die Biosynthese von Selenoproteinen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von
Frau Dipl.-Ernähr. Cornelia Riese

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Werner Kloas
 2. Prof. Dr. Josef Köhrle
 3. Prof. Dr. Gudrun A. Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2007

Zuerst die Beobachtungen und der Versuch,
dann das Denken ohne Autorität,
die Prüfung ohne Vorurteil!

Rudolf Virchow

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das essentielle Spurenelement Selen	6
1.2	Zur medizinischen Bedeutung von Selen	8
1.3	Se-Metabolismus	9
1.4	Selenoproteine und ihre Funktionen	11
1.4.1	Die Iodothyronin-Deiodasen	12
1.4.1.1	Iodothyronin-Deiodase Typ 1	12
1.4.1.2	Iodothyronin-Deiodasen Typ 2 und 3	13
1.4.2	Die Glutathion-Peroxidasen	14
1.4.2.1	Zytosolische Glutathion-Peroxidase	15
1.4.2.2	Gastrointestinale Glutathion-Peroxidase	16
1.4.2.3	Plasmatische Glutathion-Peroxidase	16
1.4.2.4	Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase	17
1.4.3	Das Selenoprotein P	17
1.4.3.1	Die SePP Knock-out Maus	18
1.4.4	Die Thioredoxin-Reduktasen	20
1.5	Biosynthese der Selenoproteine	21
1.6	Se-Metabolismus unter Se-Mangel - Hierarchienbildung	23
1.7	Einfluss des Geschlechts auf den Se-Metabolismus	28
1.7.1	Klinische Bedeutung des Geschlechts bei Erkrankungen	28
1.7.2	Einfluss des Geschlechts auf die Selenoprotein-Expression	30
1.8	Allgemeine Regulation der Proteinbiosynthese	32
1.9	Zielsetzung der Arbeit	33
2	Materialien und Methoden	34
2.1	Materialien und Chemikalien	34
2.2	Mäuse: Zucht, Haltung und Analysen	35
2.3	Molekularbiologische Methoden	37
2.3.1	Northern Blot	37
2.3.2	Realtime-PCR	39
2.4	Enzymatische Bestimmungen	40
2.4.1	Probenvorbereitung für die enzymatischen Assays	40
2.4.2	Bestimmung der Glutathion-Peroxidasen	41
2.4.3	Bestimmung der Thioredoxin-Reduktasen	42
2.4.4	Bestimmung der Deiodasen	43
2.5	Fluorimetrische Bestimmung von Se	45
2.6	Proteinbiochemische Methoden	46
2.6.1	Immunologischer Nachweis von Selenoproteinen mittels Western-Blot	46
2.6.2	Quantitative SePP Bestimmung mittels ELISA	48
2.6.3	Bestimmung proinflammatorischer Zytokine	48
2.7	Zellkultur	49
2.7.1	Zelllinien und Kulturbedingungen	49
2.7.2	Stimulation mit Steroidhormonen	49
2.8	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	51

3.1	Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in der C57Bl/6 Maus bei adäquater Se-Versorgung	51
3.1.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum	52
3.1.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere	54
3.1.2.1	Diskrepanz zwischen Dio1 mRNA und Dio1 Aktivität in der Leber	55
3.1.2.2	Inverse Korrelation von SePP mRNA und Dio1 Aktivität	55
3.1.3	Selenoprotein-Expression in Schilddrüse und Herz	56
3.2	Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr	57
3.2.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum unter Se-Mangel	57
3.2.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere unter Se-Mangel	59
3.2.3	Zusammenfassung der Dio1 Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr	61
3.3	Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit vom Mausstamm bei adäquater Se-Versorgung	62
3.3.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentration in Leber, Niere und Serum der BALB/c Mäuse unter adäquater Versorgung mit Se	62
3.3.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere der BALB/c Mäuse unter adäquater Versorgung mit Se	64
3.3.3	Zusammenfassender Vergleich der BALB/c mit den C57Bl/6 Mäusen unter adäquater Versorgung mit Se	65
3.3.4	Vergleich der Selenoprotein-Expression in Se-suffizienten und Se-defizienten BALB/c Mäusen	66
3.4	Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit vom Alter	67
3.4.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum von 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen	67
3.4.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse	69
3.4.3	Zusammenfassender Vergleich der 1 Jahr alten Mäuse mit den 60 d und den 35 d alten Mäusen unter adäquater Versorgung mit Se	70
3.5	Einfluss von Kastration oder Ovariectomie auf die Selenoprotein-Expression im C57Bl/6 Mausmodell	70
3.5.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum	71
3.5.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere	74
3.6	Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in der SePP Knock-out Maus	76
3.6.1	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentration in Leber, Niere und Serum der SePP-KO Maus	76
3.6.2	Expression der Deiodasen in Leber und Niere der SePP-KO Maus	79
3.6.3	Selenoprotein-Expression in der Schilddrüse der SePP-KO Maus	81
3.7	Mögliche Ursachen für die geschlechtsspezifische Selenoprotein-Expression im C57Bl/6 Mausmodell	81
3.7.1	Expression von EF _{SEC} , SBP2, L30 und der β -Lyase in Leber und Niere	82

3.7.2	Expression der TmT 1 in Leber und Niere	83
3.8	Selenoprotein-Expression in Zellkultur	84
3.8.1	Selenoprotein-Expression in HepG2 Zellen	85
3.8.2	Selenoprotein-Expression in COS-7 und FTC 133 Zellen	87
4	Diskussion	88
4.1	Diskrepanz zwischen mRNA Konzentration und Proteinmenge bei der hepatischen Dio1 und SePP Expression	89
4.2	Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression in C57Bl/6 Mäusen bei suffizienter Se-Versorgung	90
4.3	Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr	102
4.4	Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit vom Alter	106
4.5	Geschlechtseinfluss auf die Selenoproteinbiosynthese in Abhängigkeit vom Mausstamm	111
4.6	Geschlechtsspezifische Selenoprotein-Expression im SePP-KO Mausmodell	114
4.7	Resumée und Ausblick	117
	Zusammenfassung	119
	Summary	120
	Literaturverzeichnis	121
	Abkürzungsverzeichnis	130
	Abbildungsverzeichnis	132
	Tabellenverzeichnis	134
	Publikationsverzeichnis	134
	Anhang	136
	Lebenslauf	136
	Selbständigkeitserklärung	137
	Danksagung	138

1 Einleitung

1.1 Das essentielle Spurenelement Selen

Das Halbmetall Selen (Se) stellt für Mensch und Tier ein essentielles Spurenelement dar [Köhrle et al. 2000(1)]. Als Selenocystein (SeCys) ist es Bestandteil von Selenoproteinen und bei allen bekannten Selenoenzymen an der Katalyse beteiligt. SeCys ist die 21. proteinogene Aminosäure, deren Einbau durch den genetischen Code vorgegeben und spezifiziert wird. Erst in den letzten Dekaden rückte Se aufgrund zunehmender Erkenntnisse über dessen einzigartigen Metabolismus und wegen des gesundheitlichen Potentials von Se-Supplementationen zur Vermeidung und Therapie von Erkrankungen in den Mittelpunkt der Forschung. 1817 wurde Se durch den schwedischen Chemiker Berzelius entdeckt und aufgrund seines silbrig-grauen Glanzes nach der griechischen Mondgöttin Selene benannt. Se befindet sich in der VI. Hauptgruppe und gehört zu den Chalkogenen. Es ist chemisch dem Schwefel sehr ähnlich, weist aber neben den nicht-metallischen auch metallische Eigenschaften auf. Se fällt hauptsächlich als Beiprodukt bei der Kupfer-, Blei- und Silbergewinnung ab und findet Anwendung überwiegend in der Glasveredelung und aufgrund seiner Halbleiter- und photoelektrischen Eigenschaften in der Elektroindustrie [Barceloux et al. 1999(2)].

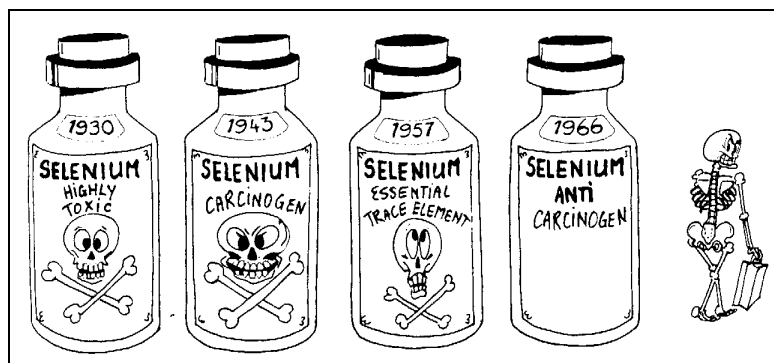


Abb. 1.1 Veränderung der Sichtweise auf die biologische Funktion von Se in den letzten Dekaden; Se durchlebte eine regelrechte Metamorphose, ausgehend als toxische Substanz wird es seit 1957 zunehmend als potentiell und vielversprechendes Antikarzinogen der Neuzeit betrachtet [Vernie 1984(3)].

Schwarz & Foltz erkannten erstmals 1957 die essentielle Bedeutung von Se. Sie zeigten, dass ein Se-Mangel bei Nagern zu Lebernekrosen führt [Schwarz et al. 1957(4)]. Bis

dato galt es als toxische Substanz. In den siebziger Jahren wurden die Glutathion-Peroxidasen als die ersten Selenoproteine beschrieben [Flohé et al. 1973(5); Rotruck et al. 1973(6)]. Heutzutage schreibt man dem Halbmetall eine breit gefächerte positive biologische Bedeutung in inflammatorischen, infektiösen sowie autoimmunen Erkrankungen, als auch für die Krebs-Prävention zu [Rayman 2000(7)].

Eine ausreichende Se-Versorgung von Mensch und Tier über die Nahrung ist stark vom Se-Gehalt des Bodens, der Düngemittel und dem Futter der Nutztiere abhängig, da deren Stoffwechsel die Se-Menge in den pflanzlichen und tierischen Nahrungsmitteln bestimmt. Dementsprechend ist der Se-Status der Menschen regional sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zu den ausreichend mit Se versorgten Amerikanern weisen die Europäer im Durchschnitt, aufgrund des geringeren Se-Gehaltes im Boden, einen eher suboptimalen Se-Status auf [Neve 2000(8); Thomson 2004(9)]. In Deutschland zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle mit einer höheren Se-Bodenkonzentration in den nördlich gelegenen Agrarflächen [Hartfiel et al. 1988(10)]. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine altersabhängige tägliche Se-Aufnahme von ca. 1 µg Se pro Kilogramm Körpergewicht [DGE Beratungs-Standards 2004(11)]. In manchen Fachkreisen zeichnet sich aber eine Tendenz zu einer höheren Empfehlung für die tägliche Se-Einnahme ab, wobei zurzeit Werte von bis zu 120 µg/d diskutiert werden [Thomson 2004(12)]. Erste toxische Symptome des Spurenelementes sind erst bei regelmäßiger täglicher Zufuhr von über 800 µg Se zu beobachten. In Se-reichen Gegenden Chinas wurden bei einer mittleren täglichen Aufnahme von bis zu 1,5 mg Vergiftungserscheinungen festgestellt [Yang et al. 1983(13)]. Eine Se-Vergiftung kann je nach aufgenommener Dosis und Se-Form lebensbedrohliche gastrointestinale Verätzungen und Barrierestörungen hervorrufen. Generell stellen Atembeschwerden und kardiovaskuläre Dysrhythmien und ein markant nach faulem Rettich riechender Atem neben einer Rotpigmentierung von Haut und Haar typische Selenosis-Symptome dar [Barceloux et al. 1999(2)].

1.2 Zur medizinischen Bedeutung von Selen

In den letzten Jahren zeigte sich, dass ein Se-Mangel zur Ausprägung bzw. Verstärkung der Symptomatik einiger Krankheitsbilder führen kann. Dazu gehören z.B. die Infertilität, inflammatorische und kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen sowie manche Krebsformen [Rayman 2000(7)].

Die männliche Fertilität, insbesondere die Spermienreifung und -funktion, scheint von einer ausreichenden Se-Versorgung abhängig zu sein [Hansen et al. 1996(14)] und infertile Männer profitieren von einer zusätzlichen Se-Einnahme [Vezina et al. 1996(15)]. Bei Sepsis, einem Zustand der generalisierten hyperinflammatorischen Reaktion auf eine Infektion, wurde über den erfolgreichen Einsatz einer Se-Supplementation bei Patienten mit niedrigen Serum Se-Konzentrationen berichtet [Gärtner et al. 2001(16)]. Die Se-Gabe induzierte einen Anstieg der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität, welche als mögliche Ursache für die bessere Genesung diskutiert wird. Weiterhin ließ sich bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis, einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung, eine Reduktion der Thyroidperoxidase-Antikörperkonzentration durch eine Se-Einnahme als Selenomethionin oder Selenit erzielen [Duntas et al. 2003(17); Gärtner et al. 2002(18)]. Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis und Asthma, verbesserte eine zusätzliche Se-Gabe den Krankheitsverlauf [Baum et al. 2000(19); Hasselmark et al. 1993(20); Peretz et al. 1992(21)].

Eine zunehmende Bedeutung findet eine Se-Supplementation in der Krebsprävention und bei der adjuvanten Behandlung von Krebspatienten. Epidemiologische Untersuchungen ergaben, dass ein niedriger Serum Se-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Lungen-, Prostata- und Dickdarmkrebs einhergeht [Clark et al. 2001(22); Hartman et al. 2002(23); Russo et al. 1997(24)]. Eine tägliche Gabe von 200 µg Se als Selenhefe, welche hauptsächlich Selenomethionin enthält, hatte einen signifikant protektiven Effekt auf die Entwicklung dieser Krebsformen [Clark et al. 2001(22); Duffield-Lillico et al. 2002(25); 2003(26); Reid et al. 2002(27)]. Folgestudien, welche die Wirkung einer kombinierten Se- und Vitamin E Supplementation auf die Entstehung von Krebs untersuchen, sind vor wenigen Jahren initiiert worden. Die SELECT Studie (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) wird in einem doppelt-blinden, Placebo-kontrollierten Design die Auswirkungen von einer täglichen Supplementation mit 200 µg Selenomethionin und/oder 400 mg Vitamin E studieren. Primäres Studienziel ist

die Prostatakrebs-Prävention, geplante Studiendauer sind 12 Jahre und als Probandenkollektiv sind über 32400 Männer mittleren Alters vorgesehen [Klein 2004(28)]. Eine weitere Studie, die den Einfluss von Se und Vitaminen auf die Krebsinzidenz und die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen untersucht, sollte in Europa angesiedelt werden. Diese sog. SU.VI.MAX Studie (Supplementation avec vitamines et mineraux), wurde in Frankreich mit 13000 Probanden gestartet [Hercberg et al. 1998(29)]. Die Ergebnisse dieser Studie werden aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Supplemente wenige Rückschlüsse auf die spezifischen Wirkungen von Se erlauben. Eine weitere Studie (Precise – prevention of cancer incidence by selenium) ist in den U.S., Grossbritannien, Skandinavien und Dänemark angesiedelt. Eine erfolgreiche Durchführung dieser Placebo-kontrollierten Se-basierten Studie ist zurzeit aufgrund von mangelnder Finanzierung fraglich [Clark et al. 1998(30)].

Somit rücken zunehmend die Fragen in den Mittelpunkt, wann eine ausreichende Se-Versorgung gegeben ist, ob eine zusätzliche Se-Supplementation präventiv oder adjuvant bei einigen Krankheitsbildern zu empfehlen ist und welche Risiken damit verbunden sind.

1.3 Se-Metabolismus

Se wird über die Nahrung vorwiegend in Form Se-haltiger Proteine als Selenomethionin und Selenocystein aufgenommen (Abb. 1.2). Daneben können auch Se-haltige Salze wie Selenit (Na_2SeO_3) oder Selenat (Na_2SeO_4) verstoffwechselt werden. Diese Selenformen findet man in Spuren in Mineralwässern und Fruchtsäften, zunehmend aber auch in Nahrungsergänzungsmitteln sowie in klinisch eingesetzten Pharmaka. Bei der Aufnahme dienen Na^+ -abhängige Kotransporter oder OH^- Antiportsysteme zur effektiven Resorption aus dem Darmlumen. Die Se-haltigen Aminosäuren werden über spezialisierte Na^+ -abhängige Aminosäure-Karriersysteme analog den schwefelhaltigen Aminosäuren transportiert [Wolfram 1995(31)]. Anschließend wird das Spurenelement aus den verschiedenen Se-haltigen Verbindungen freigesetzt und zu Selenwasserstoff (H_2Se) reduziert (Abb. 1.2). Dabei wird Selenit mit Hilfe von Glutathion- und Thioredoxin-abhängigen Reduktionssystemen in Selenid überführt. Selenomethionin kann auch direkt zur Proteinbiosynthese genutzt werden, wobei es anstelle von Methionin je nach Verfügbarkeit ungezielt in körpereigene Proteine eingebaut wird. Nennenswerte struktu-

relle bzw. funktionelle Veränderungen sind für diese Selenomethionin-haltigen Proteine nicht beschrieben. Selenomethionin kann aber auch zu Selenocystein transseleniert werden [Combs et al. 1984(32)]. Das Se-Atom des Selenocysteins wird durch eine Selenocystein-spezifische beta-Lyase (β -Lyase) abgespalten und über H_2Se mittels der Selenophosphat Synthetasen (SPS) zu Selenophosphat aktiviert [Mihara et al. 2000(33); Tamura et al. 2004(34)]. Dieses Selenophosphat dient der Selenocystein-Synthetase zum Austausch der endständigen Hydroxylgruppe eines Serylrestes an der tRNA durch eine Selenolgruppe [Hatfield et al. 2002(10)]. Die entstehende Selenocysteinyl-tRNA dient dann als Substrat für die Biosynthese der Selenoproteine (siehe 1.5). Übermäßig aufgenommenes Se wird hauptsächlich über den Urin als Trimethylselenonium Ion ($(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$) oder über den Atem als Dimethyl-Selenid abgegeben [Hassoun et al. 1995(35); Nahapetian et al. 1983(36)]. Bei normaler Se-Versorgung überwiegt die Se-Exkretion über den Urin via Selenozucker [Kobayashi et al. 2002(37)].

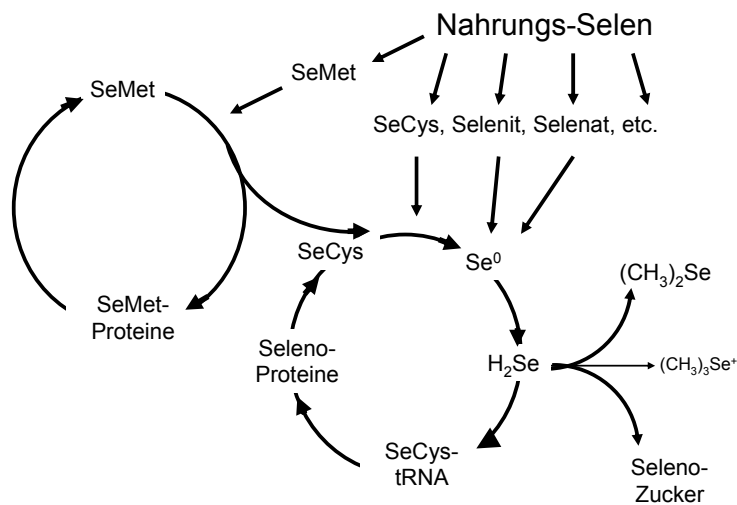


Abb. 1.2 Stoffwechsel der über die Nahrung aufgenommenen Se-Verbindungen. Selenomethionin (SeMet) kann einerseits direkt in den Methioninmetabolismus einfließen und zur Bildung von Selenomethionin-haltigen Proteinen führen. Selenocystein (SeCys) und anorganisches Se werden zu Selenwasserstoff (H_2Se) reduziert und können so zur Bildung der Selenocysteinyl-tRNA (SeCys-tRNA) beitragen, die als Substrat für die Biosynthese von Selenoproteinen benötigt wird. Überschüssiges Se wird in Form von Dimethylselenid ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$), Trimethylselenonium Ion ($(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$) oder Selenozucker mittels Urin oder Atem abgegeben [Schauder et al. 2006(38)].

1.4 Selenoproteine und ihre Funktionen

Se-haltige Proteine werden als eigentliche Selenoproteine bezeichnet, wenn sie Selenocystein (SeCys) in ihrer Struktur aufweisen. Se wird ebenfalls als Selenomethionin in Proteine eingebaut. Dieser Prozess wird allerdings durch das für Methionin zuständige Codon AUG codiert. Diese Proteine gehören nicht im eigentlichen Sinn zu den Selenoproteinen.

Die Aminosäure Selenocystein ist essentiell für die Aktivität vieler Selenoproteine bei Redoxreaktionen. SeCys liegt bei einem physiologischen pH Wert aufgrund der höheren Azidität (niedrigerem pKa Wert) überwiegend dissoziiert und geladen vor, stellt damit einen nucleophileren Redox-Reaktionspartner im Vergleich zur Thiolgruppe des Cysteins dar. Dies erklärt die höhere Redoxfähigkeit der Selenoproteine im Vergleich zu den Cystein-haltigen Proteinanaloga [Reddy et al. 1983(39)].

Bis zum heutigen Tage sind insgesamt 25 humane und 24 murine Gene bekannt, die für SeCys haltige Selenoproteine kodieren [Kryukov et al. 2003(40)]. Zu diesen gehören die Glutathion-Peroxidasen (GPx1, 2, 3, 4, 6), die Thioredoxin-Reduktasen (TrxR1, 2, 3), die Iodothyronin-Deiodasen (Dio1, 2, 3), die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2), die Methionin-Sulfoxid-Reduktase B, das Selenoprotein P (SePP) und die Selenoproteine 15, H, I, K, M, N, O, S, T, V, W, viele von ihnen mit noch unbekannter Funktion [Schomburg et al. 2004(41)].

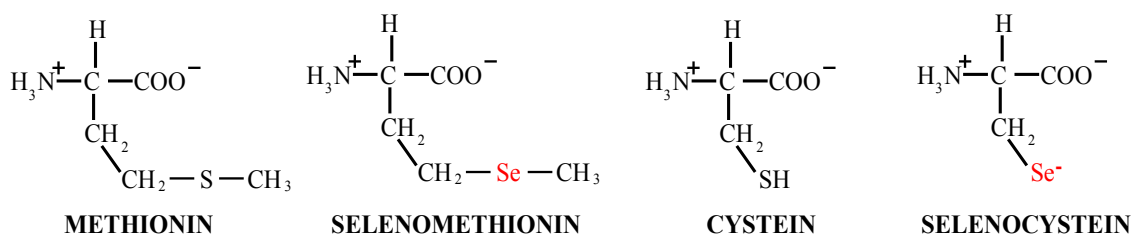


Abb. 1.3 Strukturformeln von Selenomethionin, Methionin, Selenocystein und Cystein bei physiologischem pH Wert.

1.4.1 Die Iodothyronin-Deiodasen

Die Familie der Deiodasen umfasst 3 Isoenzyme, die 5'-Deiodase Typ 1 (Dio1), die 5'-Deiodase Typ 2 (Dio2) und die 5-Deiodase Typ 3 (Dio3). Die physiologische Rolle dieser membran-assoziierten Enzyme besteht in der Aktivierung und Deaktivierung der Schilddrüsenhormone. Dabei regulieren die Deiodasen die lokale Konzentration an T3 und damit die Aktivierung Schilddrüsenhormon-spezifischer Signalwege (Abb. 1.4). Das durch die Schilddrüse sezernierte Thyroxin (T4) dient als Prohormon für 3, 5, 3'-Triiodthyronin (T3) und kann nicht an nukleäre Hormonrezeptoren binden [Bianco et al. 2002(42)].

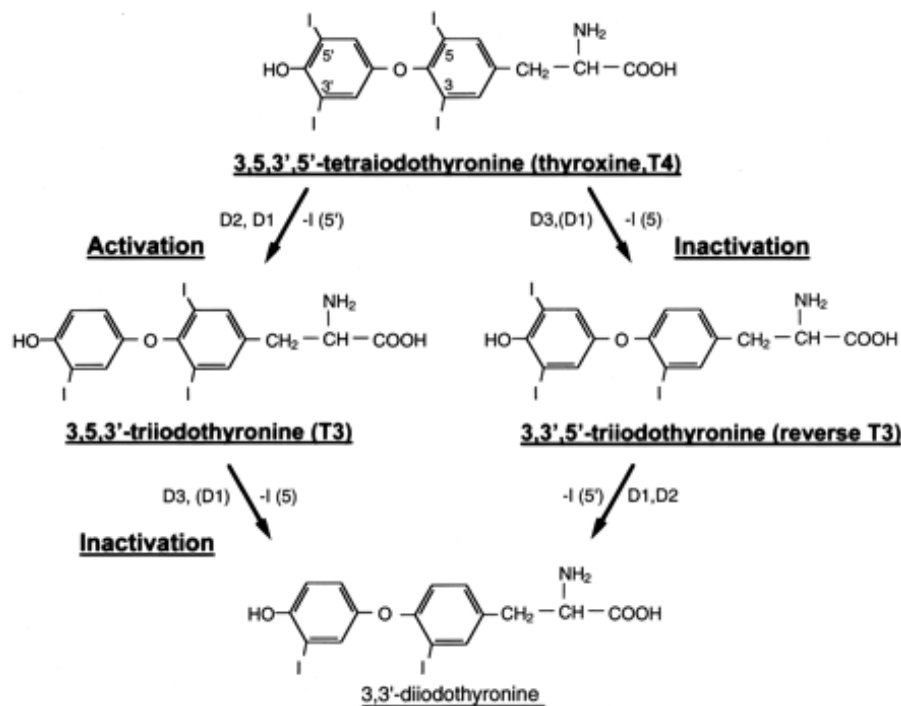


Abb. 1.4 Metabolismus der Schilddrüsenhormone, modifiziert nach [Bianco et al. 2002(42)].

1.4.1.1 Iodothyronin-Deiodase Typ 1

Die Dio1 wurde 1990 erstmals als ein Selenoprotein identifiziert [Behne et al. 1990(43); Arthur et al. 1990(44)] und wird hauptsächlich in Leber, Niere, Hypophyse und Schilddrüse exprimiert [Köhrle et al. 2002(45)]. Das nur als Homodimer aktive Enzym besteht aus einer 27 kDa Untereinheit, welche SeCys im aktiven Zentrum aufweist [Behne et al. 1990(43); Leonard et al. 2001(46)]. Die Dio1 ist in der Lage, sowohl den Phenolether-

als auch den Tyrosinring der Schilddrüsenhormone zu deiodieren, folglich kann die Dio1 sowohl T4 aktivieren als auch T4 und T3 inaktivieren [Bianco et al. 2002(42)]. Es katalysiert hauptsächlich die Monodeiodierung von 3,5,3',5'-Tetraiodothyronin (T4) und 3,3',5'-Triiodothyronin (reverses T3, rT3) (Abb. 1.4) [Bianco et al. 2002(42)]. So weist der humane Dio1 Promotor neben einem Vitamin A (Retinoid) responsiven Element auch einen T3 responsiven Bereich auf [Schmutzler et al. 1998(47); Toyoda et al. 1995(48)]. Eine Reihe von endokrinen Signalen sind in der Lage, die Dio1 Expression gewebespezifisch zu stimulieren, wie z.B. T3, T4, das Wachstumshormon (GH) als auch die Insulin-like Growth Factors (IGFs) [Baur et al. 1997(49)]. Bis kürzlich galt hauptsächlich die Dio1 Aktivität in Leber und Schilddrüse als die wichtigste Quelle für die Bereitstellung von Serum T3 im euthyreoten Organismus und damit für die systemische Versorgung mit aktivem Schilddrüsenhormon [Bianco et al. 2002(42); Köhrle 1999(50)]. Allerdings deuten Knock-out Mausmodelle (KO) mit totaler oder nur lokaler hepatischer Dio1 Defizienz eher auf eine untergeordnete Beteiligung derselben an der systemischen Versorgung mit T3 [Schneider et al. 2006(51); Streckfuss et al. 2005(52)]. Die Dio1-KO Tiere sind gesund und fertil, wiesen zwar erhöhte T4 und rT3 Spiegel im Serum auf, die T3 und TSH (Thyroid Stimulating Hormone, Thyrotropin) Konzentrationen waren aber unverändert. Somit wird sich die weitere Forschung eher auf die Bedeutung dieses Enzyms für die intrazelluläre Aktivierung von T4 zu T3 konzentrieren.

1.4.1.2 Iodothyronin-Deiodasen Typ 2 und 3

Die Dio2, in Organen wie Gehirn, braunem Fettgewebe, Placenta und Muskel vorkommend, katalysiert ausschließlich die Deiodierung des Tyrosinringes von T4 zu T3 (Abb. 1.4) [Bianco et al. 2002(42)]. Die Affinität und Spezifität der Dio2 ist im Vergleich zur Dio1 stärker ausgeprägt für die T4 Deiodierung. Die Dio2 Transkription wird durch T3 inhibiert, entgegengesetzt zur Dio1 [Burmeister et al. 1997(53)]. Es wird angenommen, dass die Dio2 besonders im Gehirn für die lokale T3 Bereitstellung verantwortlich ist [Kalsbeek et al. 2004(54)]. Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass die im Skelettmuskel exprimierte Dio2 im Menschen auch für die Bereitstellung der extrathyroidalen T3 Serumkonzentration im euthyreoten Zustand verantwortlich ist [Maia et al. 2005(55)]. Dio2-KO Mäuse wiesen keinen charakteristischen Phänotyp auf, zeigten

eine normale Entwicklung und Fertilität sowie nur minimale Wachstumsdefizite in den Männchen. Allerdings waren die Serum T4 und TSH Werte, bei konstanten T3 Spiegeln, signifikant höher im Dio2-KO Tier im Vergleich zum Wildtyp. Anscheinend bedarf es der Dio2 Aktivität, um eine effiziente TSH Feedbackregulation sicherzustellen [Schneider et al. 2001(51)].

Die Dio3 wird in Plazenta, im Gehirn, im Uterus schwangerer Frauen, in der Haut sowie in fetalen und neonatalen Geweben exprimiert und kann T4 und T3 durch Deiodierung des Phenoletherringes inaktivieren, somit rT3 und 3,3'-Diiodothyronin bilden (Abb. 1.4) [Hernandez 2005(56)]. Dieses Enzym verhindert die Überladung mit biologisch aktivem T3 in Gewebe und Zellen und weist neben Retinsäure, GH, cAMP etc. auch Schilddrüsenhormon responsive Elemente im Promotor auf [Hernandez 2005(56)]. Durch das Dio3-KO Modell konnte die entscheidende Beteiligung der Dio3 an der Entwicklung und Feedbackregulation der Schilddrüsenachse bestätigt werden. Die Dio3-KO Jungtiere zeigten erhöhte T3 Serum Konzentrationen und eine Überexpressionen T3 induzierter Gene im Gehirn. Bei adulten Dio3-KO Tieren beobachtete man Merkmale ähnlich eines Hypothyroidismus, wie niedrige Serum T3 und T4 Spiegel und einen nur geringfügigen Anstieg von TSH [Hernandez et al. 2006(57)].

1.4.2 Die Glutathion-Peroxidasen

Die Glutathion-Peroxidasen (GPx) sind eine Enzymfamilie, die hauptsächlich vor oxidativen Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies oder Peroxide schützen. Diese Enzyme katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden zu deren analogen Alkoholen in Gegenwart von Glutathion oder alternativen Thiolen als Elektronendonatoren. Die antioxidative Funktion der Glutathion-Peroxidasen deutet auf eine Beteiligung der GPx an diversen zellulären Prozessen, wie inflammatorischen Reaktionen und Apoptose, Krebs oder dem Alterungsprozess [Gärtner et al. 2001(16); Sinitsyna et al. 2006(58)]. Bis heute sind insgesamt 6 verschiedene Glutathion-Peroxidasen identifiziert worden, von denen 5 Enzyme zu den Selenoproteinen gehören: die zytosolische GPx (cGPx; GPx1), die gastrointestinale GPx (GiGPx; GPx2), die Plasma GPx (pGPx; GPx3), die Phospholipidhydroperoxid-GPx (PHGPx; GPx4) und die GPx6. Die GPx6 scheint nur im Wachstum und im olfaktorischen Epi-

thel exprimiert zu werden und nur die humane Form des Enzyms stellt ein Selenoprotein dar [Kryukov et al. 2003(40)].

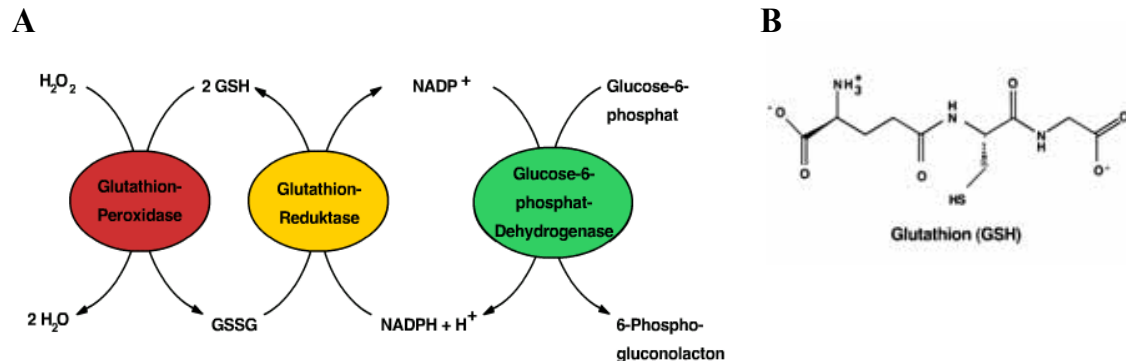


Abb. 1.5 A) Verbindung des Glutathion-Redoxsystem mit dem Pentosephosphatzyklus zur Bereitstellung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Reduktionsmittel. B) Chemische Struktur des Tripeptids Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin).

1.4.2.1 Zytosolische Glutathion-Peroxidase

Die GPx1 ist das erste identifizierte Selenoprotein und besteht aus vier 22 kDa schweren Untereinheiten [Flohé et al. 1973(5); Rotruck et al. 1973(6)]. Sie wird zwar ubiquitär in nahezu allen Geweben exprimiert, ist aber in gewebespezifischen Konzentrationen vorhanden, wobei Leber und Erythrozyten die höchsten Konzentrationen in der Ratte aufweisen [Behne et al. 1983(59)]. Das Enzym katalysiert die Reduktion von löslichen organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid durch Glutathion als spezifischen Elektronendonator zu biologisch stabilen Alkoholderivaten bzw. Wasser und ergänzt damit die Funktion von Vitamin E als Radikalfänger [Flohé 1997(60)]. Allerdings zeigten GPx1-KO Mäuse keine pathologischen Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe [Ho et al. 1997(61); Sunde et al. 1997(62)]. Erst unter extremen Zuständen oxidativen Stresses wie nach einer Verabreichung von Paraquat, einem Kontaktherbizid, oder einer Infektion mit einem normalerweise harmlosen Cocksackie Virus B3 Stamm zeigten die GPx1-KO Tiere pathologische Veränderungen [Beck et al. 1998(63); Cheng et al. 1998(64)]. Man schließt daraus, dass unter normalen Bedingungen der Verlust der GPx1 durch andere antioxidative Mechanismen weitgehend kompensiert werden kann und erst unter außergewöhnlichen Bedingungen die Funktion dieses Enzyms unabdingbar wird.

1.4.2.2 Gastrointestinale Glutathion-Peroxidase

Die GPx2 ist in Aufbau und Funktion der GPx1 sehr ähnlich und wird ausschließlich im Epithel des Gastrointestinaltraktes und zusätzlich in geringen Mengen in der humanen Leber exprimiert [Esworthy et al. 1998(65)]. Es ist ein tetrameres Protein und katalysiert den Abbau verschiedener Hydroperoxide. Dabei ist vermutlich die Hauptfunktion dieses Enzyms die Reduktion der über die Nahrung aufgenommenen Lipidhydroperoxide [Chu et al. 1993(66)]. Neueste Erkenntnisse schreiben der GPx2 eine Beteiligung am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung und damit möglicherweise bei der Entwicklung von kolorektalem Krebs zu [Al-Taie et al. 2004(67); Florian et al. 2001(68)]. Die doppelte KO Maus für GPx2 und GPx1 wies lokale intestinale Pathologien auf, wie die Entwicklung einer Kolitis [Esworthy et al. 2001(69)] oder eine erhöhte durch Bakterien induzierte intestinale Krebsrate [Chu et al. 2004(70)]. Offenbar ist das Zusammenspiel der beiden Glutathion-Peroxidasen im Darm entscheidend.

1.4.2.3 Plasmatische Glutathion-Peroxidase

Die GPx3 ist ein extrazelluläres tetrameres Glykoprotein [Takahashi et al. 1987(71)]. Der Pool von GPx3 im Plasma wird hauptsächlich durch die Niere bereitgestellt, es wird aber auch in Herz, Plazenta, Lunge und in der Schilddrüse exprimiert [Avisar et al. 1994(72)]. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms beträgt allerdings nur 10% der GPx1 Aktivität bei Verwendung von Glutathion als Elektronendonator [Takahashi et al. 1987(71)]. Da die Glutathionkonzentration im Plasma für eine optimale Aktivität der GPx3 zu gering ist, wird davon ausgegangen, dass Glutathion nicht explizit zur Verfügung stehen muss. Auch Thioredoxin und Glutaredoxin erwiesen sich als gute Reaktionspartner für die GPx3 [Bjornstedt et al. 1994(73)]. Neben der antioxidativen Rolle im extrazellulären Raum, scheint die GPx3 die Oxidation von Plasmaproteinen bzw. deren Nitrierung durch Peroxynitrit zu verhindern [Arthur 2000(74)]. Die Expression dieses Enzyms wird zusätzlich durch eine Reihe von Ernährungs- und Umweltfaktoren beeinflusst, wie z.B. einer vermehrten ROS Expositionen, der Tageszeit sowie der Se-Zufuhr [Finley et al. 1991(75); Kim et al. 1999(76)].

1.4.2.4 Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase

Dieses 19,7 kDa große Monomer war das zweite identifizierte Selenoenzym und kommt ubiquitär sowohl zytosolisch als auch membran-assoziiert vor [Roveri et al. 1994(77)]. Im Gegensatz zu den anderen GPx Isoformen, kann die GPx4 direkt Phospholipid- und Cholesterolhydroperoxide reduzieren und synergistisch mit Vitamin E die oxidative Zerstörung von Membranen verhindern [Thomas et al. 1990(78)]. Eine eindeutige Funktion der GPx4 konnte in der Spermatozytentwicklung festgestellt werden, was die hohe Expression dieses Proteins im Hoden erklärt [Behne et al. 1986(79)]. Als Protein der äußeren Mitochondrienmembran der Spermien scheint es an der Stabilisierung der Mitochondrienkapsel insbesondere im Mittelstück beteiligt zu sein und damit eine Funktion als Matrixkomponente zum Ende der Spermienreifung wahrzunehmen [Ursini et al. 1999(80)]. Darüberhinaus entsteht durch alternatives Splicing noch eine zusätzliche nukleäre Form des Enzymes [Pfeifer et al. 2001(81)].

1.4.3 Das Selenoprotein P

Das ca. 50 kDa große Selenoprotein P (SePP) ist ein extrazelläres Glykoprotein, welches hauptsächlich durch die Leber exprimiert und sezerniert wird und in Ratten mehr als 50% des Gesamtselengehaltes im Plasma darstellt [Read et al. 1990(82); Yang et al. 1987(83)]. SePP wurde erstmals 1977 im Plasma entdeckt und es besitzt im Gegensatz zu den anderen humanen Selenoproteinen 10 SeCys [Hill et al. 1991(84)]. Neun befinden sich zusammen mit 10 weiteren Cysteinresten im C-terminalen Drittel des Proteins, der kleineren Proteindomäne (Abb. 1.6). Die größere Domäne im N-terminalen Bereich beinhaltet das 1. SeCys, 7 Cysteine und die histidinreichen Regionen [Hill et al. 1991(84)]. Der Einbau der Selenocysteine in die Peptidkette wird durch zwei SECIS (SelenoCystein-Insertions-Sequenz) Elemente im 3'-untranslatierten Bereich in Kombination mit den UGA-Kodons eingeleitet [Burk et al. 1999(85)]. Studien lassen vermuten, dass die 9 SeCys Reste des C-Terminus für den Se-Transport zuständig sind und der einzelne SeCys Rest eine katalytische Aktivität von SePP vermitteln könnte [Saito et al. 2004(86)]. Innerhalb des Moleküls befinden sich zwei histidinreiche Domänen, welche die Bindung zu Heparin (Glucosaminoglykan, Gerinnungshemmer des Blutes) oder zur Zellmembran ermöglichen [Hondal et al. 2001(87)]. In der Ratte sind 4 Isoformen beschrieben worden, wobei neben dem vollständigen SePP mit 10 SeCys Resten

auch C-terminal trunkierte Proteine mit nur 1, 2 oder 6 SeCys vorliegen können [Hondal et al. 2001(87)]. Dabei stammen alle 4 Isoformen von der gleichen mRNA ab. Transfektionsexperimente im Zellsystem mit dem humanen SePP Promotor konnten inhibitorische Einflüsse auf die SePP Synthese durch pro-inflammatorische Faktoren wie Tumor Nekrose Faktor alpha, Interleukin 1 beta sowie Interferon gamma zeigen, was eine Reduktion von SePP in inflammatorischen Zuständen, wie in der Akutphasen Reaktion, vermuten lässt [Burk et al. 2005(88); Mostert et al. 2003(89)]. Die physiologische Funktion von SePP wird bis heute diskutiert. Studien mit radioaktivem Se (^{75}Se) lassen vermuten, dass dieses Protein hauptsächlich für den Transport und die Speicherung von Se zuständig ist und damit gezielt periphere Organe mit Se versorgt [Motsenbocker et al. 1982(90)]. SePP reduziert aber auch Phospholipid-Hydroperoxide in Gegenwart von Thioredoxin [Saito et al. 1999(91); Takebe et al. 2002(92)] und verhindert durch Peroxonitrit induzierte endotheliale Schäden an der inneren Gefäßwand, könnte damit antioxidative Funktionen im vaskulären System wahrnehmen [Arteel et al. 1998(93)]. Eine weitere mögliche Funktion wird in der Detoxifizierung von Quecksilber (Hg), durch die Bindung von Se und Hg in äquimolaren Mengen an SePP vermutet [Yoneda et al. 1997(94)].



Abb. 1.6 Struktur des Selenoprotein P mit 10 Selenocysteinresten (Sec, grün) im Molekül, 9 im C-terminalen und einem SeCys Rest im N-terminalen Bereich, zusätzlich 2 histidinreiche Bereiche und einem Signalpeptid (SP) für die Sekretion [Saito et al. 2004(86)].

1.4.3.1 Die SePP Knock-out Maus

Das SePP Knock-out Mausmodell (SePP-KO) wies einen charakteristischen Phänotyp mit gewebespezifischen Veränderungen der Se- und Selenoprotein-Konzentrationen auf [Hill et al. 2003(95); Schomburg et al. 2003(96)]. Die Mäuse zeigten sowohl Wachstums-, Fertilitäts- und Koordinationsstörungen als auch epileptische Anfälle beginnend mit dem 20. Lebenstag unter Se-armer Fütterung. Dieser komplexe Phänotyp betraf überwiegend die männlichen Tiere. In der fünften Woche starben spontan 10-30% der

homozygoten SePP-KO Mäuse unter Se-armer Ernährung. Bei ausgeprägter Se-Mangelversorgung überleben SePP-KO Mäuse nicht [Hill et al. 2003(95)]. Alle SePP-KO Tiere wiesen stark reduzierte Körpergewichte und -größen auf (Abb. 1.7). Die Se-Konzentrationen und GPx Aktivitäten waren signifikant in Niere, Plasma, Hoden und im Gehirn der SePP-KO Mäuse reduziert. Indes zeigte die SePP-KO Leber eine Akkumulation von Se und eine resultierende höhere GPx Aktivität, jedoch bei einer reduzierten hepatischen GPx1 mRNA Konzentration im SePP-KO Tier im Vergleich zum Wildtyp [Schomburg et al. 2003(96)]. Die verminderte GPx3 Aktivität im Plasma ging nicht mit einer Reduktion der renalen GPx3 Transkriptmenge einher [Schweizer et al. 2004(97)]. Indes waren die TrxR Aktivitäten in Leber und Niere zwischen den verschiedenen Genotypen vergleichbar. Eine Reduktion der TrxR Aktivität wurde nur im Gehirn und im Hoden beobachtet. Das SePP-KO Mausmodell lässt eine differenzierte Abhängigkeit der einzelnen Gewebe von der Se-Versorgung über das in der Leber synthetisierte SePP vermuten. Insbesondere die Se-Versorgung von Niere, Herz, Plasma und Gehirn scheinen von der hepatischen SePP Synthese und Sekretion abhängig zu sein. Die Supplementation schwangerer SePP-KO Mäuse mit Selenit zeigte eine Wiederherstellung der Se- und Selenoprotein-Konzentrationen des Nachwuchses bis in Bereiche des Wildtypes [Schweizer et al. 2004(97)]. Spätere Untersuchungen an Leberspezifischen SePP-KO Mäusen deuten darauf hin, dass das Gehirn noch über zusätzliche Mechanismen verfügen muss, um den Se-Bedarf zu decken [Schomburg et al. 2004(41)]. Die Leber-spezifische SePP-KO Maus zeigte nicht den charakteristischen Phänotyp der totalen SePP-KO Maus. Ferner wiesen diese Tiere keine Veränderungen in den GPx Aktivitäten und Se-Konzentrationen im Gehirn auf. Es wird vermutet, dass das Gehirn unabhängig von der hepatischen Se-Versorgung via SePP in der Lage ist, Se zu resorbieren. Eventuell kann es Se wiederverwerten bzw. lokal bei Bedarf vermehrt SePP synthetisieren [Richardson 2005(39); Schweizer et al. 2005(98)]. Desweiteren scheint auch die Schilddrüse unabhängig von der hepatischen SePP Synthese zu sein. Die unter Se-Defizienz üblicherweise reduzierten Dio1 und GPx Aktivitäten sowie Parameter der Schilddrüsenhormonachse waren unverändert in den Schilddrüsen der SePP-KO Mäuse [Köhrle 2005(99); Schomburg et al. 2006(100)]. Damit scheint die Schilddrüse eine Sonderstellung in der Se-Versorgung einzunehmen und noch weniger als das Gehirn von der hepatischen SePP Synthese abhängig zu sein.

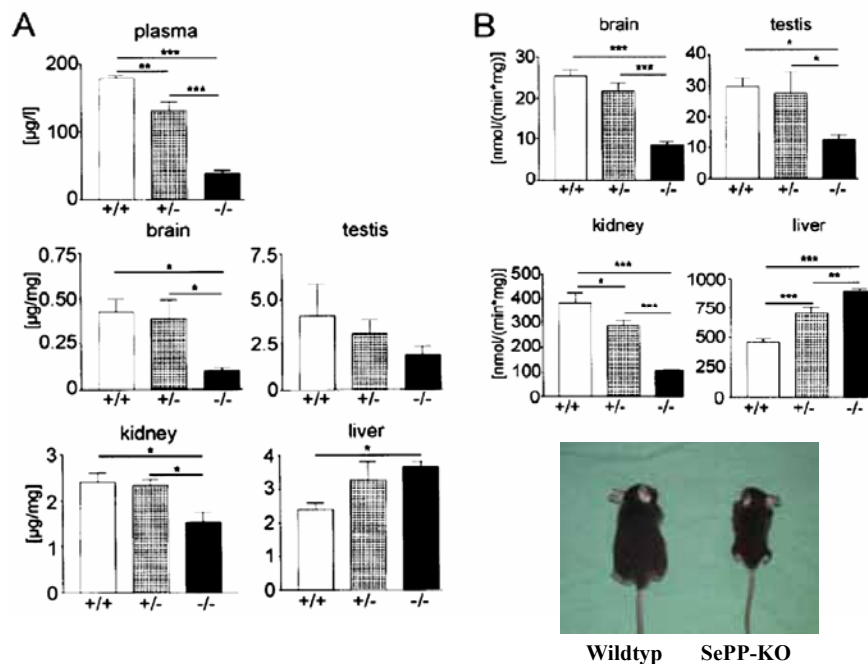


Abb. 1.7 Se-Konzentrationen (A) und GPx Aktivitäten (B) in Wildtyp (+/+), Heterozygot (+/-) und SePP-KO Maus (-/-). Im SePP-KO Tier war eine Reduktion der Se-Konzentrationen (A) und GPx Aktivitäten (B) in Plasma, Niere, Hoden und Gehirn messbar. Der Se-Gehalt und die GPx Aktivität der Leber stieg dagegen im SePP-KO an. Die SePP-KO Tiere wiesen stark verringerte Körpermaße auf [Schomburg et al. 2003(96)].

1.4.4 Die Thioredoxin-Reduktasen

Die Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) in Säugetieren sind homodimere Flavoenzyme mit 55 kDa schweren Untereinheiten und können oxidiertes Thioredoxin in einer NADPH abhängigen Reaktion reduzieren. Dieses steht dann wiederum dem zellulären Redoxkreislauf zur Verfügung und kommt in verschiedenen Reaktionen zum Einsatz [Gladyshev et al. 1999(101)]. Die hohe Substratvielfalt der TrxR gewährt z.B. die Bereitstellung von reduzierenden Äquivalenten für die Ribonukleotid Reduktase in der DNA Synthese oder für einige redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie Fos und Jun [Xanthoudakis et al. 1992(102)]. Die TrxR scheinen an der Regulation des Zellwachstums und an der Hemmung apoptotischer Prozesse beteiligt zu sein [Gromer et al. 2004(103); Powis et al. 2000(104)]. Die Essentialität dieser Selenoproteinfamilie und deren Bedeutung in der frühen Embryogenese verdeutlicht die Letalität der TrxR-KO Mäuse [Conrad et al. 2004(105); Jakupoglu et al. 2005(106)]. Insgesamt umfasst diese Familie 3 bekannte Isoformen. Die TrxR1 ist ein zytosolisches Enzym mit 2 Unterein-

heiten von 56 kDa und wird hauptsächlich in Leber, Niere, Herz und im Zytosol exprimiert [Gladyshev et al. 1999(101)]. Im Gegensatz dazu ist die TrxR2 im Mitochondrium und im Hoden nachweisbar [Miranda-Vizuete et al. 2002(107)] und die TrxR3 in Leber, Niere, Herz und in den Mitochondrien vorhanden [Gladyshev et al. 1999(101), Lee et al. 1999(108)].

1.5 Biosynthese der Selenoproteine

Die komplexe Biosynthese der Selenoproteine in Eukaryonten wird entscheidend durch die Bioverfügbarkeit von Se beeinflusst. Für die Synthese dieser Proteine sind neben dem Vorhandensein der SeleoncysteinyI-tRNA sowohl die Struktur des Transkripts als auch die Verfügbarkeit der selenoprotein-spezifischen Translations-Kofaktoren ausschlaggebend. SeCys, durch die SeleoncysteinyI-tRNA bereitgestellt, wird in die wachsende Proteinkette eingebaut, wenn das Kodon UGA in Kombination mit einer spezifischen Haarnadelstruktur im 3'-untranslatierten Bereich des Transkripts auftritt. Diese Schleifenstruktur beinhaltet die Selenoprotein-spezifischen SECIS Elemente [Hatfield et al. 2002(10)]. Nur im Zusammenspiel mit dem SECIS Element erfolgt kein Translationsstop, welcher im Normalfall durch das UGA Kodon codiert wird. Allerdings kann unter Se-Mangel das UGA Kodon trotz SECIS als Terminationssignal fungieren und damit zum Abbau der mRNA führen („Nonsense-Mediated-Decay“) [Sun et al. 2002(109)].

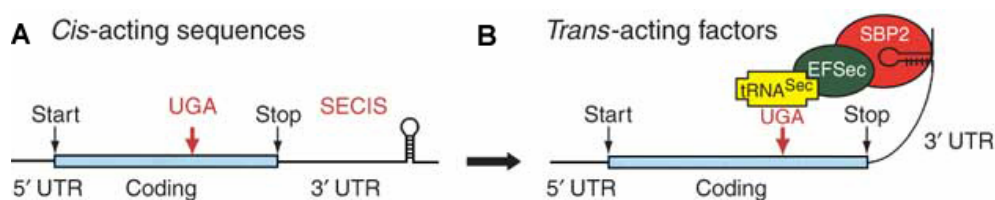


Abb. 1.8 Benötigte Komponenten für den Einbau von Selenocystein A) „Cis-Acting“ Sequenzen der Selenoprotein mRNA bestehend aus dem UGA Kodon in Kombination mit einer spezifischen Haarnadelstruktur im 3'-untranslatierten Bereich, welche das SECIS Element (SelenoCystein-Insertions-Sequenz) aufweist. Der offene Leserahmen ist als blauer Balken mit Start und Stop angedeutet. B) Selenoprotein-spezifische Translationsfaktoren: das SECIS bindende Protein 2 (SBP2), der SeCys-spezifische Elongationsfaktor (EF_{SEC}) und die SeleoncysteinyI-tRNA (tRNA^{SEC}) [Dumitrescu et al. 2005(110)].

Neben den sogenannten „Cis-acting sequences“ sind weitere spezifische Faktoren („Trans-acting factors“) notwendig (Abb. 1.8, Abb. 1.9). Das SECIS bindende Protein 2 (SBP2) registriert das SECIS Element [Copeland et al. 1999(111); Low et al. 2000(112)]. Es gehört zusammen mit dem SeCys-spezifischen Elongationsfaktor (EF_{SEC} oder SelB) [Fagegaltier et al. 2000(113)], welcher an die SeleocysteinyI-tRNA bindet und diese an das Ribosom dirigiert, zum sog. Selenosom. Erst kürzlich konnte ein weiteres Protein, das ribosomale Protein L30, identifiziert werden, welches mit dem SBP2 um die Bindung an das SECIS Element konkurriert [Chavatte et al. 2005(114)].

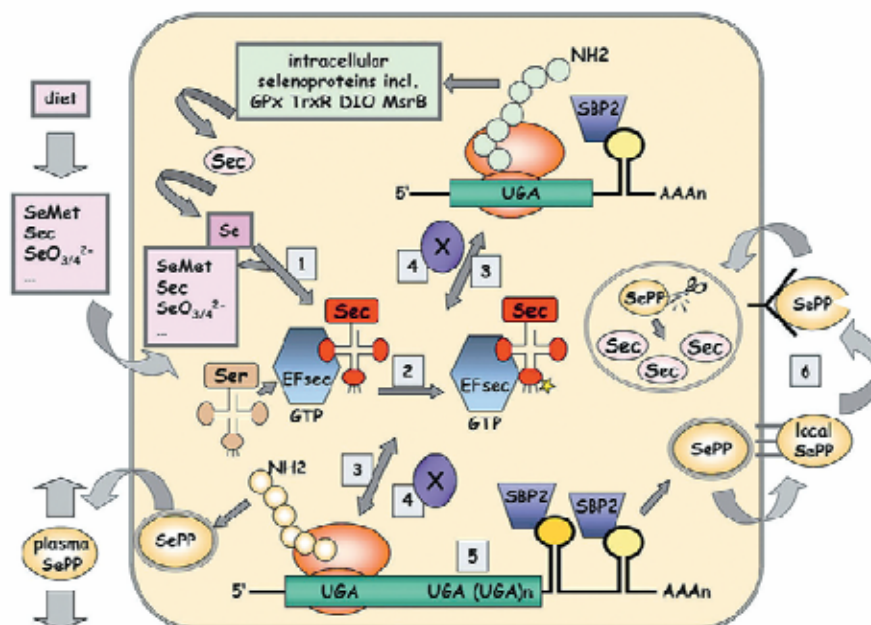


Abb. 1.9 Zusammenfassende Darstellung des Se-Metabolismus auf molekularer Ebene. 1) Über die Nahrung aufgenommenes Se wird reduziert und durch Phosphorylierung aktiviert. Dann steht es für den Austausch der Hydroxyl-Gruppe im Seryl-Restes (Ser) einer tRNA zur Bildung von SeleocysteinyI-tRNA zur Verfügung. 2) Posttranskriptionelle Veränderungen führen zur Existenz von 2 tRNA Isoformen, die sich durch eine Methylgruppe im Antikodon unterscheiden. 3) Das Verhältnis der tRNA Isoformen zueinander bestimmt die Biosynthese verschiedener Selenoproteine. 4) Zusätzliche Faktoren (X) werden für eine effiziente Translation einiger Selenoproteine benötigt. 5) Zwei Sec-Insertions-Sequenzen bedingen das ungehinderte Ablesen mehrerer UGA Kodons und damit den Einbau von 10 SeCys Resten in das Selenoprotein P (SePP). 6) Nach Sekretion von SePP in den extrazellulären Raum bindet es lokal oder im Plasma an Zelloberflächen, wo es eventuell einem SePP Zyklus unterliegt, der durch eine gezielte proteolytische Spaltung eingeleitet werden kann [Schomburg et al. 2004(41)].

Die unter 1.3 erwähnte Selenocysteinyl-tRNA kann in zwei Isoformen auftreten, die sich durch die Anwesenheit einer Methylgruppe an Position 34 des Antikodons (wobble position) unterscheiden. Somit verfügt eine Isoform über die Base Methylcarboxymethyl-5'-Uridin (mcm^5U). Methylcarboxymethyl-5'-Uridin-2'-O-methylribose (mcm^5Um) ist dagegen Bestandteil der zweiten methylierten Isoform. Das Verhältnis der beiden Isoformen ist entscheidend für die Biosynthese ausgewählter Selenoproteine und wird maßgeblich durch die Se-Verfügbarkeit und das Gewebe bestimmt (siehe 1.6, Abb. 1.9) [Hatfield et al. 2002(10); Schomburg et al. 2004(41)].

1.6 Se-Metabolismus unter Se-Mangel - Hierarchienbildung

Ein manifester Se-Mangel führt nur in Kombination mit zusätzlichen Störgrößen im Menschen zur Ausprägung 3 bekannter klinischer Krankheitsbilder. Die Keshan Krankheit stellt eine Kardiomyopathie dar, die endemisch in sehr Se-armen Gebieten Chinas auftritt [Ge et al. 1983(115)]. Dabei wird für den Ausbruch der Krankheit eine zusätzliche Infektion mit dem Cocksackie-Virus verantwortlich gemacht [Beck et al. 2003(116)]. Beim Myxödematösen Kretinismus liegt sowohl eine körperliche als auch eine geistige Retardierung vor. Bei diesem hypothyreoten Krankheitsbild ergänzt sich ein Se- mit einem Jod-Mangel, resultierend in reduzierten Schilddrüsenhormonwerten während der frühen Postnatalphase [Zimmermann et al. 2003(117)]. Eine vermehrte Aufnahme von Thiocyanat-Ionen gilt als weiterer Kofaktor für die Ausprägung dieser Krankheit [Thilly et al. 1990(118)]. Als Ursache wird eine Zerstörung der Schilddrüse in den ersten Lebensjahren angenommen, die aufgrund vermehrter H_2O_2 Produktion infolge einer Joddefizienz und der verminderten GPx Aktivität durch den kombinierten Se-Mangel entsteht [Goyens et al. 1987(119)]. Die dritte bekannte Se-Mangel Erkrankung ist die Kashin-Beck Krankheit, die in Tibet, Sibirien oder China anzutreffen ist [Allander 1994(120)]. Die Symptomatik einer Osteoarthritis wird in diesem kombinierten Se- und Jod-Mangel durch eine zusätzliche Belastung mit z.B. Mykotoxinen aus Getreideprodukten oder Fulvinsäure aus dem Trinkwasser ausgelöst [Sudre et al. 2001(121)]. Eine Se-Supplementation wird in allen drei Krankheiten präventiv empfohlen und erfolgreich angewendet. Weitere Se-Mangelzustände können beim Menschen infolge eingeschränkter Nahrungsresorption (Morbus Crohn, Kurzdarmsyndrom, Ess-Störung) oder anderwärtiger Erkrankungen (Tumor-, Nierenerkrankungen mit Dialyse, AIDS, parenterale

Ernährung ohne Se-Supplementation) auftreten. Erst kürzlich wurde die erste Krankheit identifiziert, die durch eine Mutation im SBP2 Gen, einen Einfluss auf die Selenoprotein-Translationsmaschinerie zeigte. Die SBP2 Spiegel dieser Patienten waren erniedrigt und Störungen im Schilddrüsenhormonstoffwechsel feststellbar [Dumitrescu et al. 2005(110)]. Als wahrscheinlichste Ursache liegt ein Mangel an Deiodaseaktivität vor, die für die Aktivierung des Thyroxins (T4) in das biologisch aktive T3 benötigt werden.

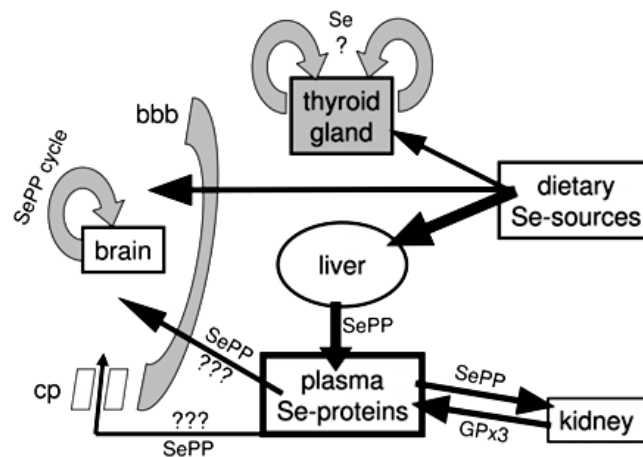


Abb.1.10 Schematische Darstellung der gewebespezifischen hierarischen Se-Ordnung. Dass in der Leber synthetisierte SePP vorsorgt vor allem die Niere und das Plasma mit Se und dient damit zur Bereitstellung der GPx3 aus der Niere. Gehirn und Schilddrüse sind nur eingeschränkt vom hepatischen SePP abhängig und verfügen anscheinend über zusätzliche Se-Aufnahme-, oder SePP Wiederverwertungs-Mechanismen. Dabei sind die Gehirn Transportsysteme über die Blut-Hirn-Schranke (bbb) oder den Choroid Plexus (cp) noch unbekannt [Schomburg et al. 2006(*100*)].

Auf molekularer Ebene ließen sich zwei Hierarchien in der Se-Versorgung feststellen. Unter Se-Defizienz wird sowohl die Se-Versorgung der verschiedenen Gewebe als auch die Expression von einigen Selenoproteinen unterschiedlich reguliert [Behne et al. 1988(122)]. Es zeigte sich, dass unter Se-Mangel Organe wie Leber, Herz, Lunge und Niere ihren Se-Gehalt schnell verloren, indes blieb in endokrinen und reproduktiven Organen sowie im Gehirn die Se-Menge relativ konstant [Behne et al. 1988(122); Brigelius-Flohè 1999(123)].

Dabei ist vermutlich die Schilddrüse in der organspezifischen Hierarchie der Se-Versorgung noch über dem Gehirn einzustufen [Schomburg et al. 2006(100); Schweizer et al. 2005(98)]. Beide Organe scheinen über zusätzliche Transportsysteme zu verfügen, die zu einer vermehrten Se-Aufnahme unter Se-Mangel verhelfen bzw. haben die Mög-

lichkeit Se wiederzuverwerten (Abb. 1.10). Ebenso konnte eine Hierarchie in der Selenoprotein-Expression unter Se-Defizienz festgestellt werden. Einige Selenoproteine reagieren schnell auf eine Se-Defizienz mit einer Reduktion ihrer Aktivitäten, mRNA- und Proteinkonzentrationen (z.B. GPx1, 3). Bei anderen wiederum vermindert erst eine andauernde Se-Defizienz die Proteinmengen (z.B. GPx2, 4). Letzteren Selenoproteinen schreibt man eine wichtigere physiologische Bedeutung als den erstgenannten zu. Ein Se-Mangel bewirkt eine drastische Reduktion der GPx1 und 3 in Organen mit reduzierten Se-Gehalten [Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sunde et al. 1997(62)]. Dabei ist die GPx1 ganz unten in der hierarchischen Ordnung der Selenoproteine anzusiedeln, also stark von einem Se-Mangel betroffen. GPx1, 3 und SePP scheinen als Se-Speicher zu dienen und dementsprechend unter Mangelbedingungen Se freizusetzen. Neben der Proteinmenge wird auch die mRNA Konzentrationen von GPx1 unter Se-Defizienz stark reduziert, wobei man dies hauptsächlich auf eine veränderte mRNA Stabilität zurückführt [Brigelius-Flohé 1999(123); Christensen et al. 1992(126)]. Somit wird zur Bestimmung des Se-Versorgungszustandes eines Individuums neben den Plasma Se-Konzentrationen auch die Plasma GPx Konzentration (aktueller Versorgungszustand) und die GPx Aktivität der roten Blutkörperchen (mittelfristiger Versorgungszustand über 3 Monate) ermittelt. Allerdings erweist sich die SePP Konzentration im Plasma als ein besserer Marker für den Se-Status. Für eine vollständige SePP Expression bedarf es im Vergleich zur GPx Expression einer größeren Se-Bioverfügbarkeit [Xia et al. 2005(127)].

Die Aktivitäten der GPx2 und 4 reduzierten sich nur minimal unter Se-Defizienz, was in Hinblick auf eine fortwährende Reproduktion und den Abbau von Hydroperoxiden bei der Nahrungsresorption sinnvoll ist [Lei et al. 1995(125); Weiss et al. 2001(128)]. Die Glutathion-Peroxidasen scheinen in folgender Reihenfolge von einem Se-Mangel betroffen: GPx1=GPx3>GPx4>GPx2 [Brigelius-Flohé 1999(123)]. Die Mitglieder der Deiodase-Enzymfamilie sind unterschiedlich stark von der Se-Bioverfügbarkeit abhängig. In Se-Defizienz wird die Expression der Dio1 in einer gewebespezifischen Art und Weise reduziert, in der Leber um 95% verglichen mit der Ausgangsaktivität. Die Dio1 Expression in der Schilddrüse bleibt dagegen konstant [Bermano et al. 1995(124)]. Die Dio2 und 3 Aktivitäten ändern sich unter Se-Defizienz kaum [Köhrle 2005(99)]. In der Hierarchie der Selenoprotein-Expression scheinen die Deiodasen gewebespezifisch be-

vorzuzug mit Se versorgt zu werden, um konstante Aktivitäten dieser Enzyme in Hinblick auf die Schilddrüsenachse auch in Se-Mangel Zuständen zu gewähren [Angstworm et al. 2004([129](#))]. Ebenfalls weit oben in der hierarchischen Ordnung sind die GPx2, 4 und die TrxR einzustufen. Die Expression dieser Proteine wird unter Se-Defizienz weniger stark beeinflusst im Vergleich zu den Biosynthesen von GPx 1, 3 und SePP.

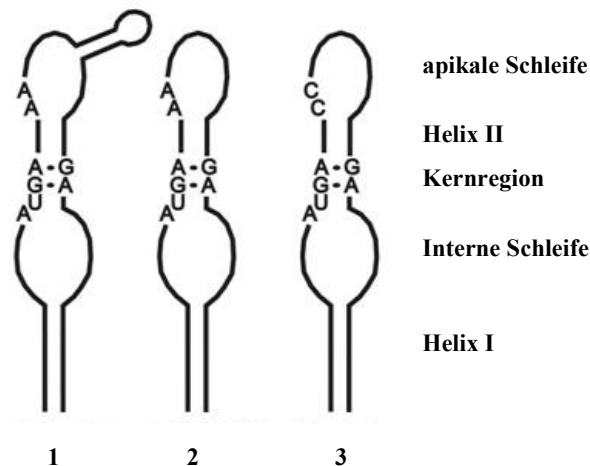


Abb. 1.11 Schematische Darstellung der 3 SECIS Formen. Dio1, GPx1 weisen die 2. SECIS Form auf; Dio2, 3 und TrxR die 1. Form; Sel M und Sel O die 3. Form. SePP zeigt sowohl die 1. als auch die 2. SECIS Form [Fagegaltier et al. 2000([130](#))].

Die mechanistischen Veränderungen unter Se-Defizienz, welche die Hierarchie in der Selenoprotein-Expression verursachen, sind bis dato nur teilweise erforscht. Es wird vermutet, dass ein vermehrter Abbau der mRNA durch den „Nonsense-Mediated-Decay“ Mechanismus (NMD) die verminderte Selenoprotein-Expression insbesondere der GPx1 und 3 verursacht [Moriarty et al. 1998([131](#)); Sun et al. 2002([109](#)); Weiss et al. 2001([128](#))]. Andere Selenoproteine wie SePP, Dio1 und GPx4 sind weniger sensitiv gegenüber dem NMD Mechanismus [Lei et al. 1995([125](#))]. Bestimmend für die Einleitung des NMD scheint die Bindungsaffinität der SECIS Elemente zu den Translations-Kofaktoren zu sein. Bei diesem Prozess schreibt man einerseits den 3 unterschiedlichen Formen der SECIS Elemente (Abb. 1.11), die sich insbesondere durch die Basenanordnungen in der apikalen Schleife unterscheiden, eine Beteiligung zu [Fagegaltier et al. 2000([130](#)); Grundner-Culemann et al. 1999([132](#)); Korotkov et al. 2002([133](#)); Low et al. 2000([112](#))]. Andererseits scheint die gewebespezifische Expression der Translations-Kofaktoren SBP2 und EF_{SEC} die Einleitung des NMD Mechanismus zu beeinflussen

[Copeland et al. 1999(111); Tujebajeva et al. 2000(134)]. Generell konnte man feststellen, dass eine vermehrte Se-Aufnahme einen Anstieg der SeleoncysteinyI-tRNA Konzentration bewirkt und folglich ein effizienterer SeCys Einbau in die wachsende Peptidkette möglich ist [Jameson et al. 2002(135)], umgekehrtes gilt im Se-Mangel.

Dem Mechanismus einer Reduktion an verfügbarer SeleoncysteinyI-tRNA im Se-Mangel wirkt bei der GPx4 Expression eine erhöhte mRNA Konzentration entgegen. Die infolge höhere Translationseffizienz resultiert in einer Proteinmenge, die letztendlich weniger stark unter Se-Defizienz vermindert ist, z.B. im Vergleich zur GPx1 [Fletcher et al. 2000(136)]. Ein weiterer Parameter, der für die hierarchische Ordnung der Selenoproteine in Abhängigkeit von der Se-Bioverfügbarkeit verantwortlich ist, stellt das Verhältnis der beiden SeleoncysteinyI-tRNA Isoformen zueinander dar. Eine effiziente Methylierung erfordert die ausreichende Verfügbarkeit von Se. So scheint die noch nicht eindeutig identifizierte Methyltransferase unter Se-Defizienz bei diesem Reaktionsschritt einen limitierenden Faktor darzustellen [Hatfield et al. 2002(10)]. Selenoprotein-Expressionen, die weniger stark durch einen Se-Mangel beeinflusst werden (Dio2, 3, GPx2, 4, TrxR 1, 3), werden folglich auch bei überwiegendem Vorliegen der unmethylierten Isoform ausreichend synthetisiert. Experimentelle Daten aus Mäusen mit mutierter SeleoncysteinyI-tRNA und infolgedessen der Unfähigkeit einer Methylierung der tRNA bestätigen dies [Carlson et al. 2005(137); Moustafa et al. 2001(138)]. In den transgenen Tieren wurden die TrxR1 und 3 vollständig exprimiert, während die GPx2, 4 und SePP nur teilweise translatiert und die GPx1 und 3 nicht synthetisiert wurden. Der Methylierungsgrad der SeleoncysteinyI-tRNA wird durch die Se-Bioverfügbarkeit reguliert und bestimmt damit maßgeblich die Expression der einzelnen Selenoproteine.

Desweiteren konnte beobachtet werden, dass die Isopentenylisierung des Adenosins an Position 37 der tRNA wichtig für die Bindungsfähigkeit der tRNA an das UGA Kodon ist [Warner et al. 2000(139)]. Eine Mutation an dieser Stelle bewirkte eine verminderte Affinität und damit eine reduzierte Aktivität der Dio1 und 2. Inwieweit dies entscheidend für die Selenoprotein-Expression in Se-Defizienz wird, bedarf zukünftiger Erforschung.

1.7 Einfluss des Geschlechts auf den Se-Metabolismus

1.7.1 Klinische Bedeutung des Geschlechts bei Erkrankungen

Es existieren nur wenige Studien, die den Einfluss des Geschlechts auf die Selenoprotein-Expression bzw. den Se-Metabolismus untersuchten [Lisboa et al. 2001([140](#)); Ogawa et al. 1999([141](#))]. Betrachtet man aber die Inzidenzraten einiger Krankheitsbilder, deren Symptomatik sich im Se-Mangel Zustand verschlechtert bzw. durch eine Se-Supplementation verbessert wird, zeigen sich eine Anzahl von Pathologien, die durch einen zugrundeliegenden Geschlechtsunterschied im Se-Metabolismus entscheidend beeinflusst werden könnten (Abb. 1.12). Insbesondere Schilddrüsen- und Autoimmunerkrankungen betreffen Frauen zu einem höheren Maße als Männer [Fairweather et al. 2005([142](#)); Knudsen et al. 2002([143](#)); Whitacre 2001([144](#)); Yu et al. 2004([145](#))]. Eine fünf- bis zehnfach höhere Anfälligkeit des weiblichen Geschlechts wurde bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen beobachtet, welche im klassischen Sinn hauptsächlich der Morbus Basedow (MB, Graves' disease) und die Hashimoto-Thyreoditis (HT) sind [Barbesino et al. 1998([146](#)); Kumar et al. 1999([147](#)); Tomer et al. 2003([148](#))]. Bei der HT liegt eine Infiltration der Schilddrüse mit T und B Zellen vor, deren Folge die Bildung von Autoantikörpern (z.B. Thyreoglobulin Antikörper, Thyroid Peroxidase Antikörper (TPO)) gegen die Schilddrüse ist. Klinisch manifestiert sich dieser Autoimmunprozess als Hypothyreose, während in der MB TSH-stimulierende Autoantikörper die Schilddrüse zur vermehrten Hormonproduktion veranlassen und sich eine Hyperthyreose entwickelt. Als Ursache für die gravierenden Geschlechtsunterschiede nimmt man neben dem Östrogeneinfluss [Paavonen 1994([149](#)); Kanda et al. 1999([150](#))] auch Abnormalitäten im X Chromosom an [Elsheikh et al. 2001([151](#)); Ivarsson et al. 1995([152](#))]. Eine Se-Gabe in Ergänzung zur herkömmlichen L-T4 Supplementation zeigte eine positive Wirkung auf die Autoantikörperbildung. Die Supplementation von 200 µg Selenit oder Selenomethionin über 3-6 Monate reduzierte die TPO Antikörper um 45-55% [Duntas et al. 2003([17](#)); Gärtner et al. 2002([18](#))]. Als Mechanismus vermutet man, dass der oxidative Schaden durch eine verminderte GPx Konzentration in der Schilddrüse unter milder Se-Defizienz, durch die Se-Gabe verhindert wird. Unglücklicherweise wurde der Geschlechtsaspekt in diesen Arbeiten aufgrund der beschränkten Anzahl männlicher Patienten nicht betrachtet. Studien zeigten jedoch, dass in Frauen

eine inverse Assoziation zwischen dem Se-Status und dem Schilddrüsenvolumen besteht und eine Se-Supplementation signifikant einen protektiven Effekt auf die Strumabildung hatte [Derumeaux et al. 2003(153)]. Dies konnte man in diesen Analysen nicht im männlichen Geschlecht beobachten.

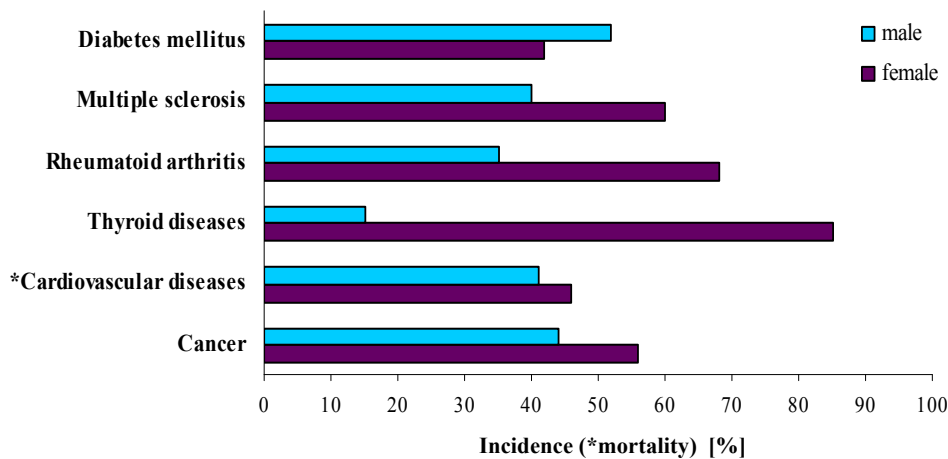


Abb. 1.12 Geschlechtsunterschiede in der Inzidenzrate (*Mortalitätsrate) weit verbreiteter Volkskrankheiten in der amerikanischen Bevölkerung 2001 (*2002) [Whitacre 2001(144)].

Aktuelle Krebsstatistiken zeigen, dass Geschlechtsunterschiede bei der totalen Krebsrate und bei den Inzidenzen bestimmter Krebsformen existieren (Abb. 1.13). Dabei konnte eine inverse Korrelation einiger Krebsformen mit dem Se-Status beobachtet werden, wobei die Plasma Se-Spiegel gesunder Menschen in beiden Geschlechtern nicht unterschiedlich sind [Batariova et al. 2005(154); Galan et al. 2005(155); Kornitzer et al. 2004(156)]. Das Krebsrisiko des männlichen Geschlechts scheint schwerwiegender durch den Se-Status beeinflusst zu werden als bei der Frau [Kornitzer et al. 2004(156); Waters et al. 2004(157)]. Niedrigere Serum Se-Spiegel korrelieren mit einer erhöhten Krebsinzidenz und Mortalität, insbesondere bei Lungen-, Kolorektal-, Magen-, und Prostatakrebs. Eine Se-Supplementation von ca. 200 µg/Tag zeigte überwiegend beim Mann eine Reduktion dieser Parameter in den genannten Krebsformen [Duffield-Lillico et al. 2002(25); Kornitzer et al. 2004(156); Waters et al. 2004(157)]. Eine inverse Assoziation des Se-Status mit dem Brustkrebsrisiko konnte nicht beobachtet werden [Hunter et al. 1990(158); van den Brandt et al. 1994(159)]. Insgesamt sind die Studien zur Rolle von Se in der Krebsentwicklung sehr heterogen und verlässliche Tiermodelle in diesem

Bereich erst in der Entwicklung. Leider wird erneut der Geschlechtsaspekt in der laufenden SELECT Studie nicht untersucht (siehe 1.2), da nur männliche Personen in die Studie einfließen. Die möglichen Se-abhängigen molekularen Ursachen für die Geschlechtsunterschiede sind noch weitgehend unbekannt.

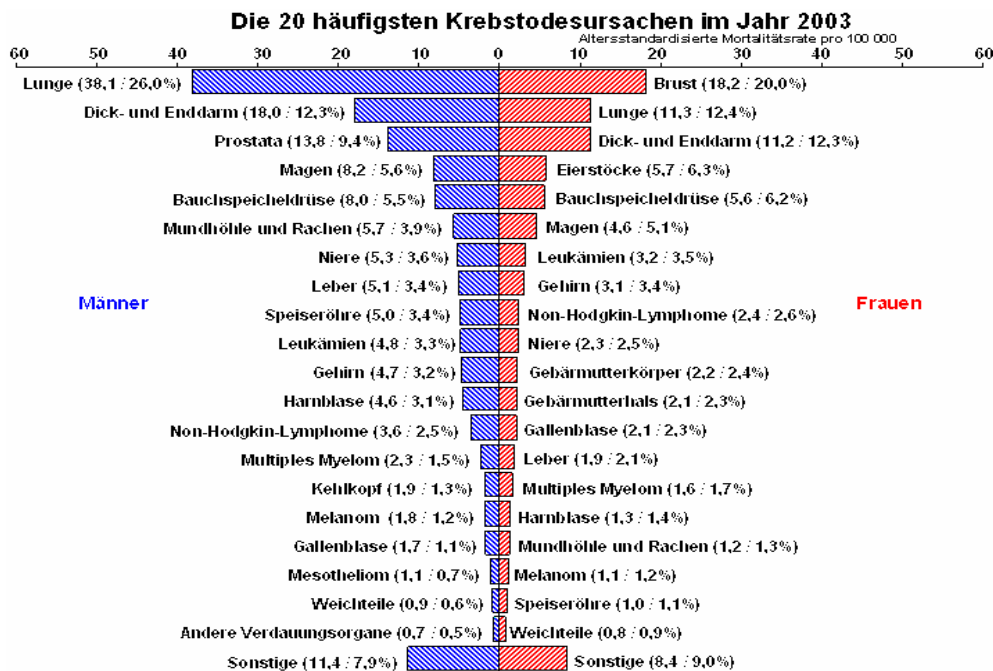


Abb. 1.13 Die verschiedenen Krebsformen als Todesursachen in Deutschland 2003, getrennt nach dem Geschlecht [Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ), 2003(160)]

1.7.2 Einfluss des Geschlechts auf die Selenoprotein-Expression

Ein Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression konnte für die GPx3 und die Dio1 gezeigt werden. Kanadische Frauen wiesen im Vergleich zum männlichen Geschlecht höhere GPx3 Aktivitäten im Serum auf [Rush et al. 2003(161)]. Italienische und französische Arbeitsgruppen konnten ferner eine Korrelation der GPx Aktivität der Erythrozyten mit den weiblichen zyklus-bedingten Schwankungen des Östrogenspiegels beobachten, mit der höchsten GPx Aktivität kurz vor dem Ovulationszeitpunkt [Gue-mouri et al. 1991(162); Massafra et al. 2000(163)]. Prämenopausale Frauen wiesen generell eine ca. 30% höhere erythrozytäre GPx Aktivität auf. Die GPx Aktivität der postmenopausalen Frau glich jener im Mann und stieg signifikant nach einer Estradiol (E2) Gabe an [Massafra et al. 2002(164)]. Über einen Einfluss von Androgenen auf die GPx3 Aktivität wurde nicht berichtet. Andere Studien bestätigen diese Beobachtungen

und stellten zusätzlich noch Korrelationen zwischen dem Östrogenspiegel, der GPx3 Aktivität und dem Serum Se-Spiegel fest [Ha et al. 2003(165)]. In ovariectomierten Ratten konnte man eine Reduktion der GPx Aktivität in Plasma und Erythrozyten messen und diese ebenfalls durch eine E2 Gabe aufheben [Munoz-Castaneda et al. 2005(166)]. Einzig in der murinen Epididymis (Nebenhoden) und dem Vas Deferens (Samenleiter), nicht aber in der Niere, wurde ein positiver Androgeneinfluss auf die GPx3 Expression beobachtet [Schwaab et al. 1998(167)].

Die Daten zur geschlechtsspezifischen Dio1 Expression stammen hauptsächlich aus Ratten. Der überwiegende Anteil dieser Arbeiten stellte eine höhere hepatische Dio1 Expression in den männlichen Tieren fest, wobei eine Kastration die hepatische Dio1 Aktivität reduzierte. Eine Behandlung mit Testosteron ließ die Aktivität wieder in den Bereich der Kontrollgruppe ansteigen [Lisboa et al. 2001(140); Harris et al. 1979(168); Miyashita et al. 1995(169); Ogawa et al. 1999(141)]. Auch eine Ovariectomie reduzierte die hepatische Dio1 Aktivität, Injektionen mit Estradiolbenzoat wirkten signifikant erhöhend [Lisboa et al. 2001(140)]. Kein Einfluss durch Östrogene konnte durch Miyashita und Kollegen beobachtet werden [Miyashita et al. 1995(169)]. Dagegen konnte Rosenthal, entgegen den oben erwähnten Daten, eine höhere Dio1 Aktivität in der weiblichen Rattenleber messen und mit dem Alter nahm diese auch nur in den Weibchen signifikant ab [da Costa et al. 2001(170)]. In der Niere zeigte sich keine geschlechtsspezifische Dio1 Expression [Ogawa et al. 1999(141)]. Die Literaturdaten zur hepatischen und renalen Dio1 Expression im Rattenmodell sind sehr heterogen und lassen kein eindeutiges Fazit über den Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Biosynthese der Dio zu.

1.8 Allgemeine Regulation der Proteinbiosynthese

Da die vorliegende Arbeit sowohl Regulationen auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene zeigt, soll an dieser Stelle kurz auf die allgemeine Modifikation der Proteinbiosynthese eingegangen werden. Die Biosynthese eines Zielproteins, damit die Transkription und die Translation, kann durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst werden. Einerseits besteht die Möglichkeit der direkten Regulation der Transkription durch die Präsenz von entsprechenden Transkriptionsfaktoren oder durch responsive Bereiche im Promotor des Gens. Diese Effekte beeinflussen die Transkription und führen zu einer erhöhten oder verringerten mRNA-Synthese. Andererseits können auch posttranskriptionelle Effekte auftreten. Dabei werden Prozesse wie der Transport der mRNA aus dem Zellkern, das Splicing, die mRNA Stabilität bzw. Halbwertszeit oder die cytosolische Assoziation der mRNA an bestimmte subzelluläre Strukturen der Zelle beeinflusst. Die Translation selbst kann durch die Verfügbarkeit beteiligter Translationsfaktoren, spezifischer Substrate wie z.B. der SeCys-beladenen tRNAs oder durch entsprechende Repressor bzw. Aktivatormoleküle gesteuert werden. Diese Regulationsebene beschreibt man als Translationskontrolle. Sie ist ein Maß für die Menge an Protein, welches von einem gegebenen mRNA-Pool synthetisiert wird. Die finale Zielgröße, d.h., die Konzentration an synthetisierten Proteinen, unterliegt schließlich noch weiteren Mechanismen, die die Stabilität des Proteins, die Halbwertszeit und damit die steady-state Konzentration der Proteine kontrollieren. Hier werden entscheidende Signale durch posttranslationale Veränderungen gesetzt, wie z.B. durch Modifikationen in der Proteinfaltung, amino- oder carboxy-terminale Veränderungen des Proteins (Amidierung), kovalente Modifikationen an Seitenketten, wie z.B. Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung, Sumoylierung, Ubiquitylierung. Diese Veränderungen beeinflussen neben der Proteinstabilität bzw. Halbwertszeit auch Transport- und Aggregationsvorgänge des Proteins [Löffler et al. 1998(171); Seyffert 1998(172)].

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Selenoprotein P Knock-out Maus zeigte einen charakteristischen Phänotyp mit Wachstums-, Koordinations- und Fertilitätsstörungen sowie epileptischen Anfällen [Hill et al. 2003(95); Schomburg et al. 2003(96)]. Zusätzlich ließ sich eine spontane Sterblichkeit der homozygoten SePP-KO Tiere ab dem 30. Lebenstag beobachten. Die Ausprägung dieses Phänotyps erwies sich stark abhängig vom Geschlecht und vom Se-Gehalt des Futters. Die Se-Verteilung und Selenoprotein-Konzentration in der SePP-KO Maus veränderte sich im Vergleich zum Wildtyp (siehe 1.4.3). Interessanterweise zeigten unter Se-armer Fütterung überwiegend die Männchen diesen schweren Phänotyp.

Ausgehend von dieser Beobachtung entstand die Hypothese, dass sich weibliche und männliche Mäuse im Se-Metabolismus unterscheiden und infolgedessen unterschiedlich auf einen Se-Mangel reagieren.

Desweiteren haben humane Studien gezeigt, dass in gewissen Krankheiten, wie z.B. Krebs und autoimmunen Erkrankungen, der Se-Status entscheidend für die Ausprägung der Symptomatik ist und die Patienten von einer Se-Supplementation profitieren (siehe 1.7.1). Dabei wiesen diese Krankheiten oft deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in den Inzidenzraten, dem Krankheitsverlauf (autoimmune Erkrankungen) als auch in der Sensitivität auf eine zusätzliche Se-Gabe auf. Auch in diesen Krankheiten könnte ein unterschiedlicher Se-Metabolismus im Menschen Mitursache für die geschlechtsspezifische Ausprägung der Krankheitssymptome sein.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den Se-Metabolismus in der Maus als Modellorganismus unter geschlechtsspezifischer Perspektive zu analysieren. SePP-KO Mäuse zeigten unter Se-Mangelernährung einen geschlechtsspezifischen Phänotyp. Entsprechend könnte neben dem Geschlecht und den Geschlechtshormonen auch die Se-Versorgung eine entscheidende Größe für den Se-Metabolismus darstellen. Diese drei Parameter, i.e., Geschlecht, Sexualhormone und Se-Versorgung sollen in ihrer gegenseitigen Abhängigkeit untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurden über folgende Firmen bezogen: Sigma GmbH, Deisenhofen; Roth GmbH, Karlsruhe; Roche Diagnostik GmbH, Mannheim; Merck, Darmstadt. Die Plastikmaterialien für die Zellkultur sowie das Medium Dulbecco's MEM (1x) wurden bei der Biochrom AG, Cambridge, UK; das Medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM:F12) bei der Invitrogen GmbH, Karlsruhe erworben. Die erwähnten RT-Primer, als auch die Primer für die cDNA Sonden wurden ebenfalls über Invitrogen bestellt.

Tab. 1 Benutzte Lösungen und Kits

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>Northern Blot</i>	
20-fach SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-citrat; pH 7,0; autoklaviert
20-fach SSPE	3 M NaCl; 0,2 M Na-Phosphat; 0,02 M EDTA; pH 7,5; autoklaviert
Waschlösung	2-, 1- und 0,5-fach SSPE; 0,3% SDS
20-fach MOPS	0,4 M Mops; 0,1 M CH ₃ COONa; 0,09 M NaOH; 0,01 M EDTA; pH 7,0; autoklaviert
Prähybridisierungslösung/ Hybridisierungslösung	50% Formamid; 30% 20-fach SSPE; 0,5% SDS; 100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA
Waschpuffer 1	50 mM Tris, pH 7,5; 2,5 mM EDTA, pH 8,0; 21g/l LiCl
Waschpuffer 2	10 mM Tris; 1,25 mM EDTA; 7 g/l LiCl
Elutionspuffer	0,5 mM EDTA, pH 8,0
Sonden-Markierungs-Kit	NeBlot TM Kit, Biolabs New England
Sequenzierungs-Kit	BigDye Terminator Sequencing Kit; Applied Biosystems; Weiterstadt
Klonierungs-Kit	pGEM®-T Easy, Promega GmbH, Mannheim
<i>Realtime-PCR</i>	
cDNA Synthese-Kit	FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot
ABsolute TM QPCR SYBR Green Mix	ABgene House, Surrey, UK
<i>Enzymatische Assays</i>	
Homogenisationspuffer	20 mM HEPES; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; pH 7,4

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>Western Blot</i>	
Probenpuffer	200 mM Tris pH 7,5; 50% Glycerin; 4% SDS; 0,04% Bromphenolblau; 50 mM DTT
Waschpuffer (TBST)	25 mM Tris; 125 mM NaCl; 0,3% Tween 20; pH 8,0
Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS; pH 8,3
Transferpuffer	190 mM Glycin; 25 mM Tris; 10% Methanol
Ponceau S	0,1% Ponceau S; 5% TCA; 3% Sulfosalicylsäure
<i>ELISA- hSePP</i>	
Waschpuffer	400 mM Tris; 3 M NaCl; 1% Tween 20; 0,001% Entschäumer
Probenpuffer	100 mM KH ₂ PO ₄ ; 200 mM K ₂ HPO ₄ ; 100 mM Na-EDTA; 0,09% NaN ₃ ; 0,1% Rind IgG; 0,1% Schaf IgG; 0,5% BSA
<i>Interleukinbestimmung</i>	
Lincoplex Kit	LINCO Research, Missouri, U.S.

2.2 Mäuse: Zucht, Haltung und Analysen

Die Mäuse wurden generell unter automatisch kontrolliertem 12 h Hell-/12 h Dunkel-Rhythmus bei Raumtemperatur gehalten und erhielten normales Laborfutter (Altromin, Lage) mit einem durchschnittlichen Se-Gehalt von 0,24 ppm (Se-suffizient) oder 0,07 ppm (Se-arm) als Selenitzugabe. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂ Inhalation. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet und das Blut entnommen. Dieses wurde nach einer einstündigen Lagerung bei 4° C, 10 min bei 10000*g und 4° C zentrifugiert, der Überstand (Serum) abgenommen und zusammen mit den anderen entnommenen Organen unter flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Mit den kommerziell erworbenen Mäusen wurde in gleicher Art und Weise verfahren. Jegliche Tierexperimente wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und durch die zuständige örtliche Behörde (LaGeSi, Berlin) genehmigt.

Tab. 2 Charakterisierung der verwendeten Mauslinien durch Mausstamm, Anzahl der weiblichen (♀) und männlichen (♂) Tiere, Tötungsalter und Se-Gehalt im Futter

Stamm	Herkunft	Alter [d]	Anzahl ♀/♂	Se-Gehalt Futter [ppm]	Sonstiges
A) C57Bl/6	Abteilung Innere Medizin, Charite	35	5/6	0,24	
B) C57Bl/6	institutseigen	35	8/10	0,07	
C) C57Bl/6	institutseigen	60	8-8-6/ 7-8-7	0,32	wt-het-SePP-KO
D) C57Bl/6	Charles-River, Sulzfeld	60	5-5/6-6	0,24	Ovx-ovx+E2/sham-kas
E) BALB/c	GSF, Neuherberg	90	10/11 10/11	0,24 oder 0,07	Se 0,07 ppm/ 0,24 ppm
F) C57Bl/6	institutseigen	360	5/6	0,24	

- A) Die C57Bl/6 Mäuse wurden freundlicherweise durch Dr. Uwe Tietge, Abteilung Innere Medizin, Gastroenterologie, Charite Berlin Campus Mitte, bereitgestellt.
- B) Die Mäuse stammten aus dem institutseigenen Tierstall und erhielten Se-armes Futter.
- C) Die institutseigene Züchtung der Selenoprotein P Knock-out Mäuse (SePP-KO) erfolgte durch Dr. Ulrich Schweizer und Marten Michaelis. Die Mäuse waren über 4-7 Generation in den C57Bl/6 Stamm rückgekreuzt und wurden durch eine DNA Analyse aus dem Ohr genotypisiert [Schomburg et al. 2003(96)].
- D) Die Anlieferung dieser Mäuse erfolgte im Alter von 4-5 Wochen. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit wurden die weiblichen Tiere unter Etherbetäubung ovariectomiert (ovx), die männlichen Mäuse kastriert (kas) oder schein-operiert (sham). Nach 2 Wochen Regeneration erhielt die Hälfte der ovariectomierten Weibchen (n=5) über 6 Tage eine tägliche subkutane Injektion mit 200 ng 17-β-Estradiol (ovx+E2) gelöst in Erdnussöl [Morishita et al. 1995(173); Tsuda et al. 2005(174)]. Die ovariectomierten Kontrolltiere wurden mit reinem Erdnussöl injiziert. Die Tötung von männlichen und weiblichen Mäusen erfolgte nach der E2 Verabreichung im Alter von ca. 60 d.
- E) Die BALB/c Tiere wurden freundlicherweise durch das Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF), AG Dr. Brielmeier in Neuherberg bereitgestellt. Es wurden 2 Gruppen (jeweils 10 Weibchen + 11 Männchen) mit unterschiedlicher Se-Zufuhr (0,07 ppm und 0,24 ppm Se im Futter) analysiert.

- F) Die Abteilung der Experimentellen Endokrinologie unter Leitung von Fr. PD Dr. Götz hat mir freundlicherweise diese 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse überlassen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Northern Blot

Probenvorbereitung

Das Northern Blotting stellt eine Standardmethode zur Detektion und Quantifizierung von mRNA Konzentrationen neben der bekannten Realtime-PCR (RT-PCR). Aus den Gewebepulvern erfolgte zunächst die RNA Extraktion mittels des Standardprotokolls von peqlab (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen), eventuell zur besseren Homogenisation mit Hilfe eines Glashomogenisators. Die Proben wurden mit den entsprechenden Volumina an peqGOLD TriFast versetzt, homogenisiert und die RNA nach einer Chloroform-Phenol-Extraktion aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und in DEPC H₂O gelöst.

Gelelektrophorese und Blotten

Die RNA Proben (10-20 µg pro Geltasche) wurden nun der Größe nach elektrophoretisch bei 80-90 V über ca. 3 h in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel (1,5% Agarose; 1% MOPS; 16% Formaldehyd (37%-ig), 3 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (500 µg/ml)) aufgetrennt. Zur Auswaschung des Formaldehyds folgte eine mindestens zweistündige Lagerung des Gels in dd Wasser bei 4° C. Anschließend wurde die fraktionierte mRNA mittels Kapillarkräften über 1-3 d mit 10-fach SSC als Transferpuffer auf eine Nylonmembran (Nytran NY 12N, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen und im Anschluss durch „UV-crosslinking“ mittels UV Bestrahlung auf der Membran fixiert (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).

Hybridisierung und Sondenherstellung

Die Membran wurde mind. 1 h bei 40° C prähybridisiert und anschließend über Nacht mit der entsprechenden radioaktiv markierten DNA Sonde bei 40° C hybridisiert (Tab. 1). Es folgten Waschvorgänge à 15 min mit einer Waschlösung von 2- bis 1/2-facher SSPE-Konzentration bei 50 bzw. 55 bzw. 60° C. Die radiographischen Signale wurden anschließend mittels eines Phosphor Imager (Cyclone storage phosphor systeme, Pa-

ckard BioScience, Dreieich) quantifiziert. Alle Daten wurden um ungleiche Gel-Beladungen zu korrigieren auf das Signal der Maus-Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Ubiquitin B schien in Niere und Leber geschlechtsspezifisch reguliert zu werden und wurde deshalb nicht zur Kalkulation der relativen Expression verwendet.

Die cDNA-Sondenherstellung erfolgte mittels PCR Amplifikation der gewünschten DNA Fragmente (ca. 300-500 bp). Die Produkte wurden mittels Klonierung in pGEM®-T Easy (E.coli JM 109 als plasmidtragende Klone) und nachfolgender Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft (Tab. 1). Anschließend wurden die cDNA Fragmente mit Hilfe eines random priming Kit (NeBlot™ Kit) nach den Angaben des Herstellers mit alpha[³²P]dCTP radioaktiv markiert (Hartmann Analytik, Braunschweig) und für die Hybridisierung nach der Hitzedenaturierung als Einzelstrang-Sonden eingesetzt.

mRNA Blot

Der mRNA Blot ist für Transkripte mit sehr geringer gewebespezifischer Expression geeignet. Dabei wird nach der RNA Isolation die mRNA durch Affinitätschromatographie an oligo-dT Matrices von den rRNA und tRNA durch mehrere Extraktionsschritte mit paramagnetischen Beads („Dynabeads“; Deutsche Dynal, Hamburg) im magnetischen Feld abgetrennt. Die „Dynabeads“ werden mit 70% Isopropanol präkonditioniert, anschließend mit Waschpuffer 1 versetzt, die RNA zugegeben (ca. 100-200 µg Gesamt-RNA pro Isolation) und 1 min bei 65° C inkubiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT zur poly-A/oligo-dT Hybridisierung und einer 1 minütigen Magnetfeld-Pelletierung wurde der Überstand abgenommen, welcher die tRNA und rRNA enthielt. Nach Waschvorgängen mit Waschpuffer 1 und 2, erfolgte die Zugabe von ca. 20 µl Elutionspuffer. Die Proben wurden leicht gevortext und 3 min bei 65° C zum Schmelzen des Heteroduplex inkubiert. Nach erneuter mind. 1-minütiger Magnetfeldeinwirkung konnte der Überstand, welcher nun die mRNA enthielt, direkt abgenommen und zur RNA Auftrennung auf das denaturierende Formaldehydgel aufgetragen werden.

2.3.2 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR (RT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion (PCR) beruht. Sie wurde hier zur Ermittlung von sehr gering exprimierten Transkripten ergänzend zur Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Die cDNA Synthese erfolgte mittels „first strand“ cDNA Synthese Kit, wobei 1 µg RNA in cDNA mit random hexamer Primer nach Angaben des Herstellers revers transkribiert wurde (Tab. 1). Um eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden intron-überspannende Primer ausgewählt und benutzt. Der 25 µl Gesamtreaktionsansatz bestand aus 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix, 5 µl einer 1:3 cDNA Verdünnung und 20 nmol der jeweiligen vorwärts (F) und rückwärts (R) Primer (Tab. 1; 3). Die RT-PCR wurde im 96 Wellformat als Duplikatmessung mit Hilfe des I-Cyclers (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA.) unter folgender Programmierung durchgeführt: Taq Aktivierung und cDNA Denaturierung 15 min bei 95° C, 40 Zyklen: 95° C für 3 s, 56° C für 45 s und 72° C für 30 s. Die jeweiligen Transkript Konzentrationen wurden auf das „Housekeeping“ Gen GAPDH der Maus als interne Kontrolle normalisiert. Die Optimierung der Zyklusbedingungen erfolgte mittels paralleler Erstellung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen eines Kontrolltemplates, so dass eine Effizienz von 1,85-2,0-facher Amplifikation je Zyklus erreicht wurde. Die Ermittlung der Expressionsraten (relative mRNA Konzentrationen) und der Signifikanzen des jeweiligen Zielgenes erfolgte mittels des Programms „Relative Expression Software Tool“ (REST 2005) [Pfaffl et al. 2002([175](#))]. Dabei stellten die männlichen Tiere die Kontrollgruppen im Männchen-Weibchen-Vergleich dar. Weiterhin wurden die schein-operierten Männchen im Vergleich zu den kastrierten Tieren und die ovariectomierten Weibchen mit E2 Gabe mit den ovariectomierten Tieren verglichen. Dabei wurden jeweils die schein-operierten Männchen und die ovariectomierten Weibchen mit E2 Gabe als Kontrollgruppen festgelegt.

Tab. 3 Vorwärts (F) und rückwärts (R) RT-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz
F-m-GAPDH	5'-GACAACTTTGGCATCGTGGAAG-3'
R-m-GAPDH	5'-CCGTTTCAGCTCTGGGATGAC-3'
F-m-SBP2	5'-GATACCTAAGGCCAAGAAGC-3'
R-m-SBP2	5'-CTCTCCACATCCTGTGAGTC-3'
F-m-L30	5'-CACCGGAAGATGGTGGCCGCAAAG-3'
R-m-L30	5'-CTTTTCACCAGGTCTGTTCTGG-3'
F-m-EF _{SEC}	5'-GCGATTGACAAAATGACCAA-3'
R-m-EF _{SEC}	5'-GTCTCTCGTTGGGATGGAAA-3'
F-m-beta-Lyase	5'-GGAGGTGGACAAGAGTGGAA-3'
R-m-beta-Lyase	5'-CGGCTGTTCAAATGGATTCT-3'
F-m-Prolaktin	5'-ATCAATGACTGCCCCACTTC-3'
R-m-Prolaktin	5'-ATTCCAGGAGTGCACCAAAC-3'
F-m-GPH	5'-ACATTGTTCCCCTCAGATCG-3'
R-m-GPH	5'-ACATGGACAGCATGACCAGA-3'
F-m-GH	5'-CTGGCTGCTGACACCTACAA-3'
R-m-GH	5'-TGGGATGGTCTCTGAGAAGC-3'
F-m-LH-beta	5'-TCTGCATCACCTTCACCACC-3'
R-m-LH-beta	5'-ACAGATGCGAACGCAAGCTC-3'
F-m-FSH-beta	5'-TGGTGTGAGGGCTACTGCTA-3'
R-m-FSH-beta	5'-ACAGCCAGGCAATCTTATGG-3'

2.4 Enzymatische Bestimmungen

2.4.1 Probenvorbereitung für die enzymatischen Assays

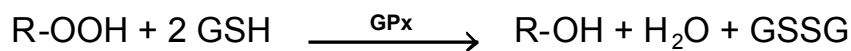
Die Gewebeproben wurden unter flüssigem Stickstoff mittels eines Dismembrators (Braun, Melsungen) pulverisiert, Aliquots von 80-100 mg Gewebepulver in ca. 600 µl Homogenisationspuffer auf Eis mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert und anschließend 10 min bei 14000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20° C gelagert und diente zur späteren Bestimmung der Glutathion-Peroxidase- und Thioredoxin-Reduktase-Aktivität sowie des Se-Gehaltes. Das Pellet wurde erneut in Homogenisationspuffer resuspendiert, mit 1 mM Dithiothreitol (DTT, Kofaktor im Deiodaseassay) versetzt, sonifiziert (Ultraschallstab, LaBsonic ®M; Braun, Melsungen) und für die Ermittlung der Deiodaseaktivität eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Homogenate wurden mit der Bradfordmethode (Bradfordreagenz: BioRad Laboratories) und IgG (BioRad, München) als Standardproteinlösung bestimmt [Bradford 1976(176)]. Die Berechnungen der enzymatischen Bestimmungen von GPx und TrxR erfolgten anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$E = \epsilon_{\lambda} * d * c$$

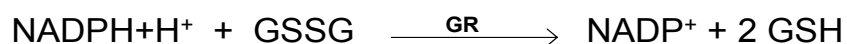
ϵ_{λ} : molarer Extinktionskoeffizient, Wellenlängen-spezifisch
d: Schichtdicke der Küvette
c: Konzentration der absorbierenden Substanz
E: Extinktion

2.4.2 Bestimmung der Glutathion-Peroxidasen

Die Aktivität der Glutathion-Peroxidasen (GPx) wurde mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests nach Flohé (1984) bestimmt [Flohé et al. 1984(177)]. Dabei reduzieren die Glutathion-Peroxidasen ein Hydroperoxid (R-OOH; R=organischer bzw. anorganischer Rest) zum analogen Alkohol (R-OH) und Wasser (H₂O), wobei Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird.



Die Glutathion-Reduktase (GR) regeneriert daraufhin das gebildete GSSG zu GSH unter Oxidation von NADPH+H⁺ zu NADH⁺. Der NADPH+H⁺ Stoffmengenverbrauch wird spektralphotometrisch (U2001, Hitachi) bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst und entspricht der umgesetzten Substratstoffmenge durch die Glutathion-Peroxidasen.



Die Enzymaktivität wurde bei RT in einem Puffer aus 0,2 M Tris; 1 mM EDTA; 4,6 mM GSH; 0,33 mg/ml NADPH+H⁺ und 2 U/ml GR (Calbiochem, Darmstadt) bestimmt. Dafür wurden 500 µl Puffer vorgelegt, das optimierte Volumen an Zellhomogenat zugegeben und mit dd H₂O auf 1000 µl aufgefüllt. Nach einer 3 minütigen Inkubation bei RT wurde durch die Zugabe des Substrates tertiär-Butylhydroperoxid (Endkonzentration: 1 mM) die Reaktion gestartet und über 3 min die Extinktion bei 340 nm vermessen. Das Zellhomogenatvolumen wurde dabei so optimiert, dass eine Extinktionsabnahme zwischen 5-10% stattfand. Zur Bestimmung der unspezifischen Oxidation von NADPH+H⁺ wurde die GPx Aktivität durch Zugabe von Mercaptosuccinat (End-

konzentration: 10 mM) inhibiert und anschließend dieser Wert von den ermittelten Aktivitätswerten subtrahiert. Die GPx Aktivität ließ sich unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ von NADPH+H⁺ $\epsilon = 6200$

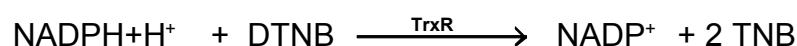
M⁻¹*cm⁻¹ nach folgender Gleichung errechnen und wurde in nmol/(min*µl) für Seren und nmol/(min*mg Protein) für Gewebe angegeben:

$$\text{GPx-Aktivität} = \frac{\Delta E_{340} / \text{min} * V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{6200 [\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} = \frac{\Delta E_{340} * [\text{mol}] * 10^6}{\text{min} * 6200 * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 ml = 1 cm³)
 ΔE_{340} : Extinktionsänderung pro min bei 340 nm
 m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg
 d : Küvettendurchmesser (1 cm)

2.4.3 Bestimmung der Thioredoxin-Reduktasen

Die Thioredoxin-Reduktaseaktivität wurde mittels Reduktion von 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoat) (DTNB; Ellman Reagenz) zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) in einer NADPH - abhängigen Reaktion als Anstieg der Absorption bei 412 nm bestimmt [Ellman 1958(178)].



Dabei wurde der Ansatz in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 10 mM EDTA; 0,2 mg/ml NADPH+H⁺; 0,2 mg/ml BSA und 2 mg/ml DNTB durchgeführt. Zunächst wurden 900 µl des Puffers vorgelegt, auf 1 ml mit dd H₂O abzüglich des Zellhomogenatvolumens aufgefüllt und der Ansatz anschließend 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Zellhomogenates gestartet. Eine Optimierung der zugegebenen Zellhomogenatvolumina erfolgte so, dass das $\Delta E/\text{min}$ über eine Messdauer von 3 min weitgehend konstant blieb. Die Thioredoxinaktivität wurde aus folgender Gleichung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von TNB $\epsilon_{\text{TNB}} = 13600 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ermittelt und in nmol/(min*mg Protein) angegeben:

$$\text{TrxR-Aktivität} = \frac{\Delta E_{412} / \text{min} * V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{[\text{nmol}/(\text{min} * \text{mg})] \cdot 13600 [\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}] * 2} = \frac{\Delta E_{412} [\text{mol}] * 10^6}{\text{min} * 13600 * m_{\text{Protein}} [\text{mg}] * 2}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 cm³)
 ΔE_{412} : Extinktionsänderung pro min bei 412 nm
 m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg
 d : Küvettendurchmesser (1 cm)

Der Faktor 2 resultiert aus dem stöchiometrischen Verhältnis der DTNB Umsetzung zu TNB, die 10⁶ ist zur Umrechnung in nmol notwendig.

2.4.4 Bestimmung der Deiodasen

In diesem Assay wird die Aktivität der Deiodasen Typ 1 und 2 durch die enzymatische Freisetzung von ¹²⁵I⁻ aus radioaktiv markiertem L-3,3',5'-[¹²⁵I]-revers Triiodothyronine (¹²⁵IrT3) bestimmt [Leornard et al. 1980(179)]. Dabei wird 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) als spezifischer Inhibitor für die Dio1 eingesetzt, welches durch Differenzmessung die gleichzeitige Analyse der Dio2 Aktivität erlaubt.

Der Test wird in einem Gesamtreaktionsansatz von 100 µl durchgeführt, wobei 50 µl als Triplikat jeweils für die ungehemmte und gehemmte Reaktion bestehend aus 10 µl H₂O oder 10 µl PTU und 40 µl der resuspendierten Membranpelletfraktion mit Proteinkonzentrationen von 20 µg für Lebergewebe, 40 µg/Niere, 100 µg/Herz und 5 µg/Schilddrüse je 50 µl Ansatz vorgelegt wurden. Der Tracer (30000-80000 cpm/100 µl Ansatz, 800 µCi/µg, PerkinElmer, MA, U.S.) wurde zunächst chromatographisch über eine Sephadex LH-20 Säule (Sigma-Aldrich, München) gereinigt, um gegebenenfalls radiolytische Abbauprodukte und nicht-enzymatisch abgespaltenes Jodid zu entfernen und anschließend in einem zweifach konzentrierten Substratmix (50 µl je Probe) gelöst.

Substratmix: 0,33 mM NaOH; 40 mM DTT; 0,2 M K₂HPO₄/KH₂PO₄ (1:1), pH 6,8; 2 mM EDTA; unmarkiertes rT3: 0,1 µM (Leber; Endkonzentration 1,0 µM in 100 µl Gesamtansatz); 0,05 µM (Niere/Herz); 0,02 µM Schilddrüse und 0,01 µM HepG2 Zellen

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Tracer-Substratmix gestartet und für 60 min (Leber/Niere) oder 120 min (Schilddrüse/Herz/HepG2 Zellen) bei 37° C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 50 µl einer Stopplösung (10% BSA in 10 mM PTU), anschließend wurde das Protein durch 400 µl eiskalter 10%-iger TCA ausgefällt, das Präzipitat bei 14000*g für 5 min zentrifugiert und 480 µl des Überstandes auf Dowex-50 WX-2 Säulen (BioRad Laboratories, Hercules, CA) gegeben und mit 2 ml 10%-iger Essigsäure das freie ¹²⁵I eluiert. Die zehnminütige Messung des freien ¹²⁵I erfolgte im Gamma-Counter (1277 Gammamaster, Turku, Finnland) und die theoretisch erreichbare totale Abspaltung von ¹²⁵I- durch die Deiodasen wurde mittels 50 µl Tracer-Substratmix in 2 ml 10%-iger Essigsäure ermittelt. Die Blindwertbestimmung erfolgte erst nach dem Abstoppen der Reaktion mittels Zugabe von 40 µl resuspendierter Pelletfraktion zu mitgeführten Kontrollproben, bestehend aus 10 µl dd H₂O. Die Bedingungen des enzymatischen Tests wurden so optimiert, dass letztendlich die Substrat-Deiodierung kleiner 15% war. Die Berechnung ergibt sich aus den gemessenen Aktivitäten wie folgt und wurde in pmol/(min*mg Protein) angegeben:

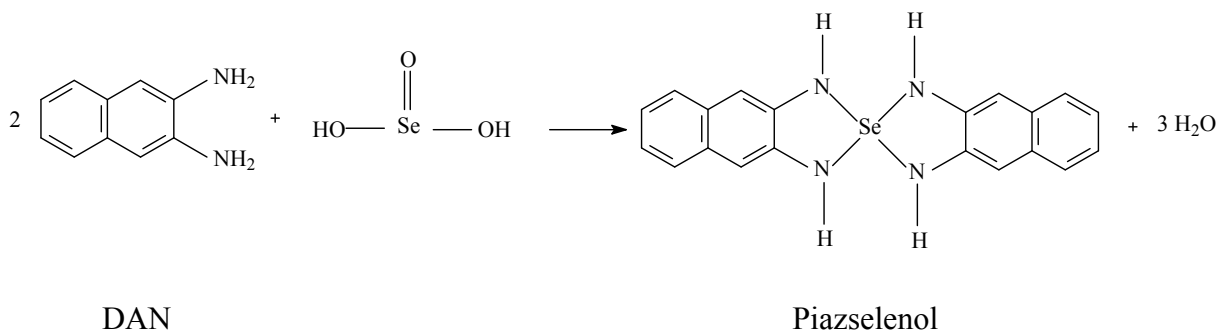
$$\text{spez. Aktivität Dio} \quad [\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})] = \frac{2 \cdot n_{\text{rT3}} [\text{nmol}] \cdot (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blind}}) \cdot 1000}{\text{cpm}_{\text{rT3 Substratmix}} \cdot 100\% \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \cdot t[\text{min}] \cdot 480/550}$$

cpm:	counts per min
cpm _{Blind} :	¹²⁵ I Freisetzung durch nichtenzymatische Deiodierung
cpm _{rT3 Substratmix} * 100% :	theoretisch denkbare totale Deiodierung von ¹²⁵ I je 100 µl Ansatz
cpm _{Probe} :	¹²⁵ I Freisetzung durch Dio Aktivität
n _{rT3} :	Stoffmenge reverses T3 in nmol
m _{Protein} :	Protein im 100 µl Ansatz in mg

Der Faktor 480/550 bezieht ein, dass nur 480 µl vom Gesamtvolumen (550µl) auf die Säule gegeben wird. Die 2 berücksichtigt, das rT3 in Position 3' oder 5' mit ¹²⁵I markiert werden kann, aber beide Iodatome (markiert und unmarkiert) durch die Deiodase abgespalten werden. Die spezifische Aktivität der ungehemmten Ansätze entspricht der Summe aus Dio1 und Dio2 Aktivität, die der gehemmten Ansätze der Dio2 Aktivität. Erst durch die Differenzbildung der spezifischen Aktivitäten von ungehemmten und gehemmten Ansätzen erhält man die spezifische Aktivität der Dio1.

2.5 Fluorimetrische Bestimmung von Se

Die Se-Bestimmung wurde leicht modifiziert nach Sheehan 1990 durchgeführt [Sheehan et al. 1990(180)]. Dabei wird die Fluoreszenz der organischen Verbindung Piazselenol gemessen, die aus Se^{IV} und 2,3-Di-Amino-Naphthalin (DAN) gebildet wird.



Bei diesem Assay wurden 100 μl Homogenat als Doppelbestimmung mit 500 μl Säuremix (1:4 HNO_3 (65%) / HClO_4 (70%)) zur Freisetzung des Se bei 190° C für mind. 2 h inkubiert. Dabei wird Se nach Se^{VI} oxidiert und die Proben erscheinen farblos. Nach Abkühlung auf RT, wurden jeweils 500 μl HCl (37%) zu den Ansätzen gegeben (Reduktion des Se^{VI} zu Se^{IV}), gemischt und die Röhrchen ca. 30 min bei 150° C offen inkubiert, bis die Entweichung bräunlicher nitroser Gase nicht mehr wahrnehmbar war. Anschließend erfolgte bei RT die Zugabe von 2 ml EDTA Lösung (2,5 mM; pH 8,0) und 600 μl DAN Reagenz (6,3 mM in 0,1 M HCl). Die Ansätze wurden 30 min bei 55° C inkubiert und das Piazselenol mit 1 ml Cyclohexan bei RT extrahiert. Nach einer Phasentrennung ü.N. wurde die Fluoreszenz der organischen Phase im Fluorimeter (LS50B, PerkinElmer; $\lambda_{\text{Anregung}}$: 364nm; $\lambda_{\text{Emission}}$: 520 nm) in Glas-Mikro-Fluoro-Küvetten bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve dienten Verdünnungen einer Natriumselenit-Standardlösung in Wasser (1000 $\mu\text{g/ml}$; Sigma). Ein kommerziell erworbener Pool humaner Seren (Sero AS, Billingstad, Norwegen) wurde zur Validierung der Methode eingesetzt. Die Se-Konzentrationen im Serum sind in ng Se/ml Serum, in Geweben in ng Se/mg Protein angegeben.

Zur Bestimmung des Gesamtselengehaltes der organischen Fraktion erfolgte eine Ausfällung von 100 μl Serum mit gleichen Volumina an 10%-iger Trichloressigsäure (TCA). Nach einer anschließenden 20 minütigen Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation bei 4° C für 15 min bei 14000*g wurde das erhaltene Pellet in 100 μl Homogenisationspuffer resuspendiert und für die Se-Bestimmung eingesetzt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Immunologischer Nachweis von Selenoproteinen mittels Western-Blot

Probenvorbereitung und SDS-PAGE

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine aus Proteingemischen. Dabei wurden die Proteine der Größe nach mittels einer SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, wobei 12,5 bis 15%-ige Trenngele (Tab. 4) je nach Größe des Zielproteins in einer Stärke von 1,5 mm zum Einsatz kamen (Tab. 5). 50-100 µg Protein versetzt mit der entsprechenden dd H₂O Menge wurden in einem Volumen von 11 µl mit 4 µl Probenpuffer versetzt (Tab. 1). Nach einem Denaturierungsschritt über 5 min bei 90° C und einer kurzen Inkubationszeit auf Eis wurde das Gel mit den Proteinproben sowie einem Marker (Prestained Marker, New England Biolabs, Ipswich, US) beladen. Es folgte die Aufkonzentrierung des Proteingemisches im Sammelgel (Tab. 4) bei einer anfänglichen Spannung von 80 V und die Auftrennung im Trenngel bei 100 V bis zum Auslaufen der Markerbande (Western-Blot-Kammer: peq-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Tab. 4 Gelzusammensetzungen

	Trenngel <u>12,5%</u>	Trenngel <u>15%</u>	Sammelgel <u>4,5%</u>
dd H ₂ O (ml)	4,30	3,65	3,10
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29/1; Roth) (ml)	3,10	3,75	0,56
Trenngelpuffer (1,5 M Tris; pH 8,8) (ml)	2,50	2,50	-
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris; pH 6,8) (ml)	-		1,25
10% SDS (µl)	80	80	50
TEMED (µl)	4	4	2,5
10% APS (µl)	40	40	25

Blotten und Immunodetektion

Der Proteintransfer erfolgte mittels des Semidry-Blot-Systems (Trans-Blot SD, BioRad) bei einer angelegten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von ca. 1 mA pro cm² Gel über 30-60 min (Membran: OPTITRAN BA-S85, Schleicher & Schuell, Dassel). Anschließend wurde der erfolgreiche Proteintransfer mittels der Ponceau-S Färbung (Tab. 1) nachgewiesen. Nach einer einstündigen Inkubation der Membran bei RT in Blockierungslösung (5% Milchpulver in TBST; Tab. 1), folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (1st Ak, Tab. 5) sowie im Anschluss ein zweimaliges Spülen und ein Waschvorgang über 6*5 min mit TBST (Tab. 1). Einer Inkubation mit dem sekundären Antikörper (2nd Ak, Tab. 5) schloss sich ein wiederholter Waschvorgang an. Der 2nd Ak war mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt („Horse Radish Peroxidase“ - HRP), welches die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysierte und damit die Detektion des Antikörperkomplexes via Lumineszenz ermöglichte. Die Immunodetektion erfolgte mittels der Entwicklerlösungen 1 und 2 (Bioscience, Buckinghamshire, UK; Detektionssystem: Kodak X-Omat 1000; Eastman Kodak Company, New York, U.S.; Röntgenfilm: HyperfilmTM ECL, Bioscience), wobei die Entwicklungsdauer der Stärke des Signals angepasst wurde (ca. 1-10 min).

Tab. 5 Westernblot-Bedingungen

Protein	Trenngel [%]	1st Ak AK Konzentration Inkubationsdauer	2nd AK AK Konzentration Inkubationsdauer
GPx1	15	goat-anti-mouse-GPx1 (DIFE, Fr. Brigelius-Flohé; Potsdam-Rehbrücke) 1/1000 ü.N.	anti-goat IgG (DAKO, Dänemark) 1/2000 1 h RT
SePP	12,5	human SePP-5c (Brahms AG, Hennigsdorf) 1,8 µg /ml ü.N.	donkey-anti-sheep IgG (Brahms) 1/10000 1 h RT

2.6.2 Quantitative SePP Bestimmung mittels ELISA

Die humane SePP Proteinmenge in den Überständen der Zellkulturansätze wurden mit Hilfe eines ELISA (Enzyme Linked Immun-Sorbent Assay) vermessen. Bei dieser Technik wird eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung anhand einer gekoppelten enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Die SePP Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Fr. Dipl. Biochem. Birgit Hollenbach in den Laboratorien der B.R.A.H.M.S. AG (Hennigsdorf bei Berlin). Dabei wird die Bestimmung der SePP Proteinmenge mittels Antikörper aus der 1. Blutung von mit SePP-Peptiden immunisierten Schafen ausgeführt. Zunächst wurde der Tracer so in Probenpuffer (Tab. 1) verdünnt, dass 10 ml dieser Tracerlösung einem RLU (relative light units) Wert von 800000 entsprachen. Zellkulturüberstände wurden ohne weitere Vorverdünnung eingesetzt und als Doppelbestimmung vermessen. Es wurden je 50 µl der Standardreihe (humanes Serum mit SePP im Normbereich) oder 50 µl des Zellüberstandes in die Röhrchen, welche mit SePP AK beschichtet waren (coated tubes; CT) pipettiert, 200 µl Tracerlösung dazugegeben und die Proben 2 h bei RT und 300 rpm im Dunkeln unter Agitation inkubiert. Es erwies sich die Kombination von CT 6c und Tracer 4c am effektivsten in der SePP Detektion. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Waschpuffer (Tab. 1) zu jedem Röhrchen. Nach dem Dekantieren des Puffers wurde der Waschvorgang dreimal wiederholt, die Röhrchen gut abgeklopft und über Kopf 20 min getrocknet. Die SePP Quantifizierung erfolgte mittels Lumineszenzmessung (Kettenluminometer von Berthold, LB 952 T716) nach Zugabe von 300 µl Basisreagenz 1 (100 mM HNO₃; 0,5% H₂O₂) und 300 µl Reagenz 2 (250 mM NaOH).

2.6.3 Bestimmung proinflammatorischer Zytokine

Mittels des Multiplex Analyse Systems (Luminex 200, Austin, U.S.) und dem LINCOplex cytokine immunoassay Kit (Tab. 1) wurden die Konzentrationen von IL-6, TNF alpha und IL-1 beta in 50 µl Serum der ovariektomierten (ovx) und ovx + E2 Weibchen sowie kastrierten und schein-operierten Männchen bestimmt. Dabei wurde entsprechend den Anleitungen des Herstellers verfahren.

2.7 Zellkultur

2.7.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Tab. 6 Zelllinien mit Kulturbedingungen

Zelllinie	Kulturbedingungen
humane Leber-Karzinom-Zellen (HepG2)	DMEM:F12 mit L-Glutamin; 10% fetales Kälberserum (FCS); Penizillin/Streptomycin 1% (P/S); 100 nM Na ₂ SeO ₃
Humane follikuläre Schilddrüsenzelllinie (FTC 133)	Dulbecco's MEM (1x) mit L-Glutamin; 10% FCS; Pen/Strep 1%; 10 nM Na ₂ SeO ₃
Fibroblastenzelllinie der Niere des afrikanischen grünen Affen (COS-7)	Dulbecco's MEM (1x) mit L-Glutamin; 10% FCS; P/S 1%; 50 nM Na ₂ SeO ₃

Zur Stammhaltung wurden die Zellen bei 37° C und einem CO₂ Gehalt von 5% in 75 cm² Kulturflaschen (T75) in den oben aufgeführten Medien als Monolayer kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte dabei alle 3-4 Tage. Je nach Wachstumsstärke wurden die Zellen alle 5-10 Tage passagiert. Dies erfolgte zunächst durch ein zweimaliges Waschen mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4). Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA (0,5% / 0,2% in 10*PBS) und einer Inkubation von 5-10 min bei 37° C vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, die Zellsuspension in Medium resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren die Zellen vereinzelt. Die Konservierung der Zellen erfolgte unter flüssigem Stickstoff (-196° C) in den oben aufgeführten Medien unter Zusatz von 12% DMSO.

2.7.2 Stimulation mit Steroidhormonen

Frühere Daten schreiben dem pH Indikator Phenolrot eine Estrogen ähnliche Wirkung zu [Ernst et al. 1989(181); Tsuda et al. 2005(174)]. Daher erfolgte eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70-80% in T75 Kulturflaschen in Phenolrot- und FCS-freien Medien. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und 48 h in FCS- und Phenolrot freien Medien mit 17-β-Estradiol (E2, Sigma) oder Dihydrotestosteron (T, Sigma) in Endkonzentrationen von 0,1; 1; 10 und 100 nM des jeweiligen Steroidhormons stimuliert. Da die Trockensubstanz der Steroidhormone in 96% Ethanol gelöst wurde (Stammlösungen 33 µM), erfolgte zur Bestimmung der Ba-

salwerte eine adäquate Zugabe von Ethanol ohne Hormonzusatz zu den entsprechenden Kontrollansätzen. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellmedien für eine spätere Selenoprotein P Bestimmung bei -20° C aufbewahrt, mit dem Zellschaber die Zellen abgelöst und mittels 2 ml eiskaltem PBS in Eppendorftubes überführt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 600*g und 4° C, ein Absaugen des Überstandes und ein Homogenisieren des Zellpellets in 200-300 µl Homogenisationspuffer (siehe 2.4.1). Anschließend wurde wie unter 2.4.2 aufgeführt weiter verfahren und die Enzymaktivitäten bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine RNA-Isolation der HepG2-Zellen für die Erstellung eines Northern Blots, wobei nach Abnahme der Medien die Zellen direkt mit 1 ml peqGOLD TriFast versetzt, mit dem Zellschaber abgelöst und in Eppendorftubes überführt wurden. Die weitere Verfahrensweise erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Die Hormonstimulationen wurden jeweils in 5-6-facher Ausführung der entsprechenden Zelllinie durchgeführt.

2.8 Statistische Auswertung

Die Werte in Graphiken als auch im Text sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Dabei wurden Einzelwerte außerhalb der zweifachen SD als Ausreißer angesehen und gingen nicht in die Berechnung mit ein. Die Signifikanzermittlung erfolgte mittels der Varianzanalyse (one way ANOVA) mit anschließenden Bonferroni's post-hoc Test in GraphPad Prism 4. Als statistisch signifikant wurde Werte mit einem p-Wert kleiner 0,05 bezeichnet ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

3 Ergebnisse

Gegenwärtig sind insgesamt 24 verschiedene Gene für Selenoproteine in der Maus bekannt [Kryukov et al. 2003(40)]. Die vorliegende Arbeit begrenzte ihre Analysen auf die Glutathion-Peroxidasen 1 und 3 (GPx1, 3), die Deiodase 1 (Dio1), das Selenoprotein P (SePP), die zytosolischen Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) und auf die Deiodase 2 (Dio2). Dabei wurde sich hauptsächlich auf die Organe Leber und Niere fokussiert, exemplarisch wurden zusätzlich Herz- und Schilddrüsendaten ermittelt.

Es zeigte sich, dass vor allem die Dio1, SePP und GPx3 Expression unter adäquater Se-Versorgung deutlich in einer geschlechts- und gewebespezifischen Art und Weise erfolgt (siehe 3.1). Dabei erwies sich die Ausprägung dieser geschlechtsspezifischen Selenoprotein-Expression stark abhängig von der Se-Versorgung (siehe 3.2), dem Mausstamm (siehe 3.3) und dem Alter der Tiere (siehe 3.4). Die Variabilität dieser 3 Einflussfaktoren bedingte nicht nur die oben aufgeführten Selenoprotein-Expressionen, sondern bewirkte auch die Bildung neuer geschlechtsspezifischer Unterschiede, zutreffend für die Aktivität der GPx1 und der TrxR. Diese Ergebnisse zeigten, dass die zu Beginn der Arbeit postulierten Geschlechtsunterschiede keine konstante Größe darstellen, sondern in ihrem Ausmaß entscheidend von äußeren Randbedingungen, wie der Se-Versorgung, dem Stamm oder dem Alter abhängen und einer entsprechenden unerwarteten Dynamik unterliegen.

3.1 Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in der C57Bl/6 Maus bei adäquater Se-Versorgung

Der Se-Status der Maus wurde mittels fluorimetrischer Bestimmung der Serum Se-Spiegel bestimmt. Eine adäquate Se-Versorgung der Maus liegt bei einem Se-Futtergehalt von ca. 0,15 ppm vor [Reeves 1997(182)], indes führt ein Se-Anteil von 0,07 ppm zu einer Se-Defizienz bzw. Se-Mangelversorgung. Die unter 3.1 betrachteten 35 d alten C57Bl/6 Mäuse (Charakterisierung A unter 2.2/Tab. 2) erhielten Futter mit adäquatem Se-Gehalt von 0,24 ppm.

3.1.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum

Die Se-Spiegel im Serum der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse zeigten bei adäquater Se-Zufuhr keine Unterschiede zwischen weiblichen (w) und männlichen (m) Tieren und lagen generell zwischen 300 und 400 $\mu\text{g/l}$ (Abb. 3.1A) [Hill et al. 2003(95); Schomburg et al. 2003(96)]. Ausgehend davon, dass SePP ca. 50% des gesamten Serum Se-Gehaltes einnimmt [Read et al. 1990(82)], wurde zusätzlich die Se-Konzentration in der organischen Fraktion nach einer TCA Fällung bestimmt. Auch in dieser Serum Fraktion, die überwiegend den Proteinanteil des Serums darstellt, waren keine Geschlechtsunterschiede messbar. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Geschlechtseinfluss auf die extrazelluläre GPx3 Aktivität im Serum beobachtet werden (Abb. 3.1B). Weibliche Mäuse zeigten eine 1,3-fach höhere Aktivität als die männlichen Tiere (w: $5,6 \pm 1,1$ versus m: $4,2 \pm 0,8$ nmol/($\mu\text{l} \cdot \text{min}$)).

Da die GPx3 im Serum hauptsächlich durch die Niere bereitgestellt wird [Avisar et al. 1994(72)], wurde die renale GPx3 mRNA Konzentration zum Vergleich hinzugezogen. Überraschenderweise konnte man, trotz der Unterschiede in den GPx3 Aktivitäten, vergleichbare Werte in den renalen GPx3 mRNA Konzentrationen beider Geschlechter messen (Abb. 3.2B).

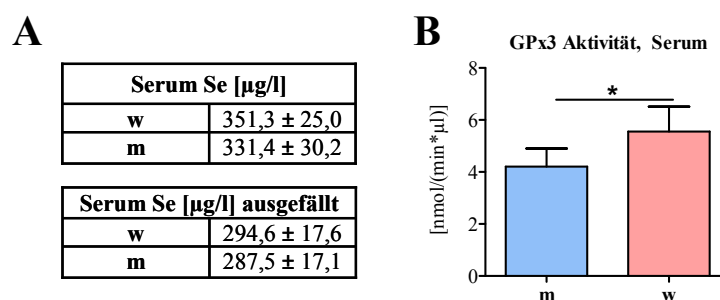


Abb. 3.1 Serum Se und GPx3 Aktivitäten der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Serum Se-Konzentrationen vor und nach einer TCA Fällung waren nicht signifikant unterschiedlich in beiden Geschlechtern (A). Eine 1,3-fach höhere Serum GPx3 Aktivität zeigten die weiblichen (w) Tiere im Vergleich zu den Männchen (m) (* $p < 0,05$; B).

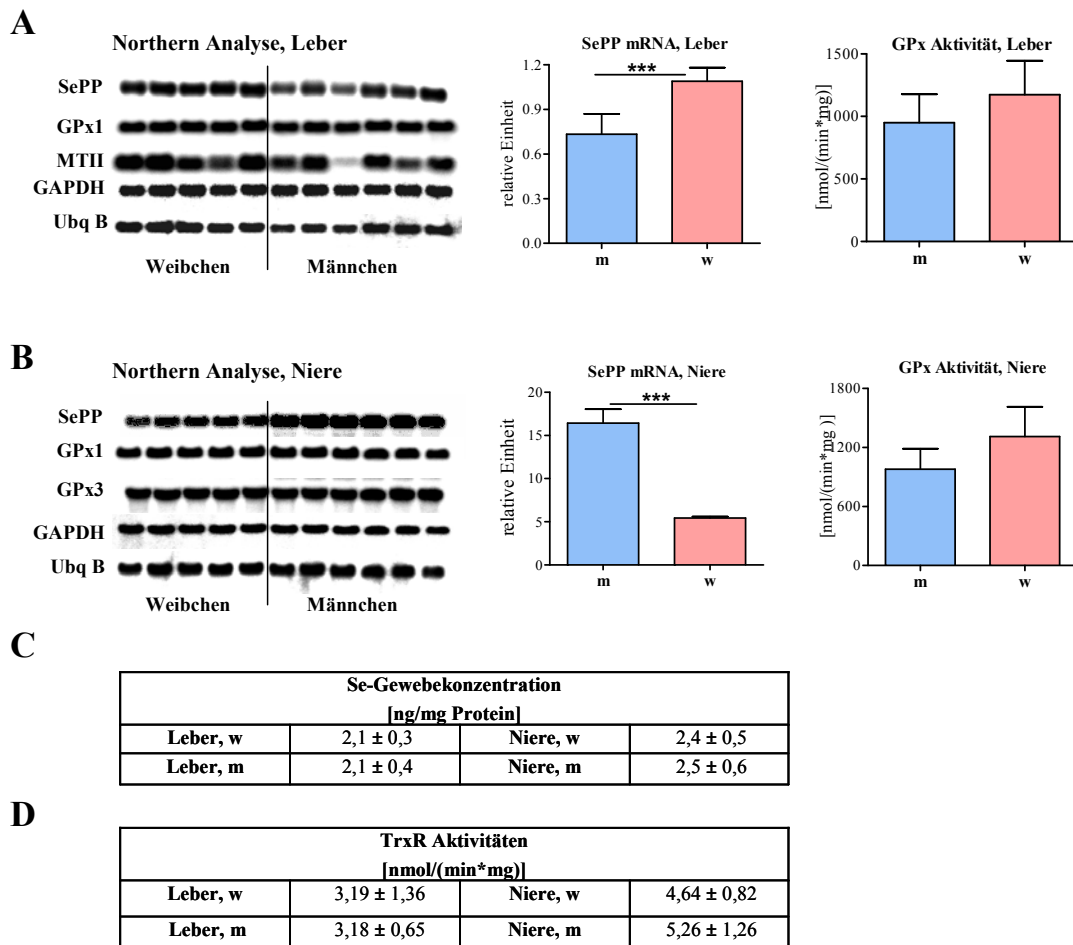


Abb. 3.2 Selenoprotein-Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit adäquater Se-Fütterung. Die Weibchen zeigten eine 1,3-fach höhere hepatische (***) $p < 0,001$), aber eine 3-fach niedrigere renale SePP mRNA Konzentration (A, B). Die GPx3 und GPx1 Transkriptmengen, die GPx und TrxR Aktivitäten und die Se-Konzentrationen in Leber und Niere waren zwischen den Geschlechtern nicht unterschiedlich (A, B, C, D). Die MT II mRNA Konzentration war 1,6-fach höher in den weiblichen Leber ($p < 0,05$; A).

Indes wiesen die SePP mRNA Konzentrationen in Leber und Niere ein deutliches geschlechts- und gewebespezifisches Expressionsmuster auf (Abb. 3.2A, B). Die Leber, Hauptsynthese- und Sekretionsort von SePP, zeigte eine 1,3-fach höhere SePP Transkriptmenge in den weiblichen Mäusen (Abb. 3.2A). In der Annahme, dass SePP den größten Anteil an Se im Plasma einnimmt, spiegelte sich dieser Geschlechtsunterschied nicht in den Se-Plasma Werten wider (Abb. 3.1A) [Read et al. 1990(82)]. In der Niere ließ sich eine inverse Regulation der SePP mRNA Konzentration nachweisen (Abb. 3.2B). Die Weibchen zeigten nur 31% der renalen männlichen SePP mRNA Konzentration. Die Analyse der Expression der ubiquitär exprimierten zytosolischen GPx1

verdeutlichte, dass sich die beobachteten Geschlechtsunterschiede nicht für alle Selenoproteine verallgemeinern lassen. Sowohl die GPx1 Transkriptmengen als auch die Aktivitäten in Leber und Niere zeigten keine geschlechtsspezifisch signifikanten Unterschiede bei adäquater Se-Zufuhr (Abb. 3.2A, B). Bekannt ist, dass die GPx1 durch den intrazellulären Se-Gehalt reguliert wird [Bermano et al. 1995(124)]. Damit korrelierte die GPx1 Expression mit den vergleichbaren hepatischen und renalen Se-Konzentrationen in Weibchen und Männchen (Abb. 3.2C).

Desweiteren konnte auch bei den hepatischen und renalen zytosolischen TrxR Aktivitäten kein Geschlechtseinfluss beobachtet werden (Abb. 3.2D).

3.1.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere

Eine unterschiedliche gewebespezifische Dio1 Expression ist bereits in verschiedenen Studien in männlichen und weiblichen Ratten gezeigt worden [Harris et al. 1979(168); Lisboa et al. 2001(140); Miyashita et al. 1995(169); Ogawa et al. 1999(141)]. In der Maus lagen noch keine Daten vor. Hier erwies sich die Dio1 Expression in einer ausgeprägten Art und Weise vom Geschlecht abhängig. Bei einer adäquaten Se-Versorgung ließ sich in der männlichen murinen Leber eine 2,8-fach höhere Dio1 Aktivität messen (m: $49,9 \pm 13,5$ versus w: $17,5 \pm 3,7$ pmol/(min*mg); Abb. 3.3). Indes zeigten die Weibchen im Vergleich zu den Männchen eine 1,8-fach höhere renale Dio1 Aktivität (w: $14,2 \pm 3,4$ versus m: $7,7 \pm 2,1$ pmol/(min*mg)) und entsprechend auch eine höhere Dio1 mRNA Konzentration in der Niere (2,6-fach; $p < 0,01$). Für die Dio2 Aktivitäten ergaben sich keine Unterschiede zwischen weiblicher und männlicher Leber (Leber-w: $0,52 \pm 0,55$ versus $0,79 \pm 0,25$ pmol/(min*mg)); renale Dio2 Aktivitäten waren nicht nachweisbar.

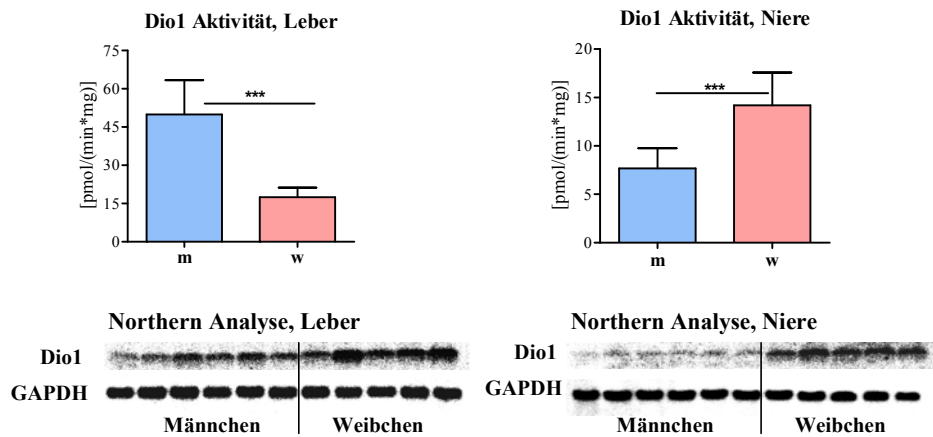


Abb. 3.3 Dio1 Expression in Leber und Niere der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Dio1 Aktivität war 2,8-fach höher, die mRNA Konzentration aber 30% niedriger in der männlichen im Vergleich zur weiblichen Leber ($p < 0,05$). In der Niere zeigten die weiblichen Tiere eine 1,8-fach höhere Dio1 Aktivität und eine 2,6-fach höhere Transkriptmenge ($** p < 0,01$).

3.1.2.1 Diskrepanz zwischen Dio1 mRNA und Dio1 Aktivität in der Leber

Überraschenderweise korrelierte der Geschlechtsunterschied der Dio1 mRNA Konzentrationen nicht mit dem Unterschied der Dio1 Aktivitäten in der Leber. Für die männlichen Tiere wurde zwar eine höhere hepatische Dio1 Aktivität gemessen, die Dio1 Transkriptmenge war indes um 30% niedriger im Vergleich zu den Weibchen (Abb. 3.3, $p < 0,05$). Dieses Phänomen wurde nur in der Leber, nicht aber in der Niere beobachtet und deutet auf eine unterschiedliche posttranskriptionelle Regulation der hepatischen Dio1 Expression in beiden Geschlechtern. Überdies erwies sich diese Beobachtung als Se-abhängig und trat weniger ausgeprägt bei Mäusen mit Se defizienter Fütterung auf (siehe 3.2.2).

3.1.2.2 Inverse Korrelation von SePP mRNA und Dio1 Aktivität

Betrachtet man die SePP mRNA Konzentrationen im Vergleich zu den Dio1 Aktivitäten in Leber und Niere, so stellt man eine gegenläufige Tendenz fest (Abb. 3.4). Ein hohe hepatische SePP Transkriptmenge ging mit einer niedrigeren hepatischen Dio1 Aktivität in weiblichen Tieren einher und vice versa in den Männchen. Ebenso verhielt es sich in der Niere. Eine niedrigere SePP mRNA Konzentration war bei Weibchen mit einer höheren Dio1 Aktivität im Vergleich zu den Männchen gekoppelt. Die Se-

Konzentrationen in Leber und Niere waren indes in Männchen und Weibchen gleich (Abb. 3.2C).

	Leber	Niere
Dio1 Aktivität	♀ < ♂	♀ > ♂
SePP mRNA	♀ > ♂	♀ < ♂
Se-Konzentration	♀ = ♂	♀ = ♂

Abb. 3.4 Tabellarischer Vergleich der Dio1 Aktivitäten mit den SePP mRNA Konzentrationen in den 35 d alten C57Bl/6 Mäusen mit suffizienter Se-Fütterung. Es zeigte sich ein gegenläufiges Expressionsmuster von Dio1 und SePP. Eine hohe Dio1 Aktivität in der männlichen Leber ging mit einer niedrigeren SePP Transkriptmenge einher, umkehrt zutreffend für die Weibchen. Die männliche Niere zeigte eine geringere Dio1 Aktivität kombiniert mit einer hohen SePP mRNA Konzentration. Die Se-Gewebekonzentrationen waren in weiblicher und männlicher Leber und Niere gleich.

3.1.3 Selenoprotein-Expression in Schilddrüse und Herz

Die Dio1 Aktivitäten in Schilddrüse und Herz zeigten die gleichen geschlechtsspezifischen Unterschiede wie in der Leber (Abb. 3.5). Die Männchen wiesen in der Schilddrüse signifikant eine 2-fach und im Herzen eine 3-fach höhere Dio1 Aktivität im Vergleich zu den weiblichen Tieren auf. Im Allgemeinen waren die Dio1 Aktivitätswerte in der Schilddrüse im gleichen Wertebereich wie in der Niere angesiedelt, die Dio1 Aktivitätswerte des Herzens fielen ungefähr um den Faktor 100 geringer aus. Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden für die Dio2 Aktivitäten in der Schilddrüse gemessen (Schilddrüse-w: $0,16 \pm 0,03$ versus m: $0,20 \pm 0,05$ pmol/(min*mg); Herz-w: $0,01 \pm 0,01$ m: versus $0,02 \pm 0,01$ pmol/(min*mg)). Weitere Analysen von Selenoproteinen ergaben keinen Geschlechtseinfluss auf die GPx Aktivitäten (Schilddrüse-w: $120,9 \pm 25,4$ versus m: $137,5 \pm 42,7$ nmol/(min*mg); Herz-w: $308,8 \pm 58,4$ versus m: $303,3 \pm 51,5$ nmol/(min*mg)) sowie die TrxR Aktivitäten (Herz-w: $6,4 \pm 1,8$ versus m: $7,6 \pm 2,8$ nmol/(min*mg)).

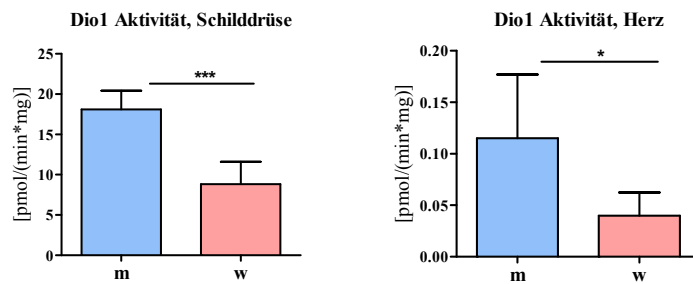


Abb. 3.5 Dio1 Aktivitäten in Schilddrüse und Herz der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse, mit suffizienter Se-Fütterung. Die Männchen zeigten eine höhere Dio1 Aktivität in der Schilddrüse (2-fach) und im Herzen (3-fach) im Vergleich zu den Weibchen.

3.2 Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr

Die Bioverfügbarkeit von Se reguliert die gewebespezifische Synthese einiger Selenoproteine (siehe 1.6). Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass auch die geschlechtsspezifische Expression von Selenoproteinen stark vom Se-Gehalt des Futters abhängt und Männchen und Weibchen anscheinend unterschiedlich auf einen Se-Mangel reagieren. Zur Untersuchung dieses Aspektes wurden 35 d alte C57Bl/6 Mäuse unter Se-armen Futter mit einem Se-Gehalt von 0,07 ppm gehalten (Charakterisierung B unter 2.2/Tab. 2).

3.2.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum unter Se-Mangel

Die Serum Se-Spiegel waren infolge der verminderten Se-Zufuhr im Vergleich zu den Mäusen mit adäquater Se-Versorgung um den Faktor 10 reduziert und zeigten erneut keine Geschlechtsunterschiede (Abb. 3.6B). Diesen Werten entsprechend konnten auch keine Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen in der hepatischen SePP Expression unter Se-Mangel festgestellt werden, entgegen den Beobachtungen unter Se-suffizienter Fütterung (Vergleich Abb. 3.6A mit Abb. 3.2A). In der Niere ließ sich erneut eine höhere renale SePP mRNA Konzentration in den männlichen Tieren messen (3,5-fach; Abb. 3.6A). Ferner zeigte sich unter Se-defizienter Fütterung eine resultierende verminderte GPx3 Aktivität im Serum (w: 18-fach; m: 15-fach), wobei die unter 3.1.1 notierten Geschlechtsunterschiede nicht mehr beobachtet werden konnten (Ver-

gleich Abb. 3.6B mit Abb. 3.1B). Die GPx3 mRNA Konzentrationen waren ebenfalls nicht unterschiedlich in beiden Geschlechtern (Abb. 3.7C).

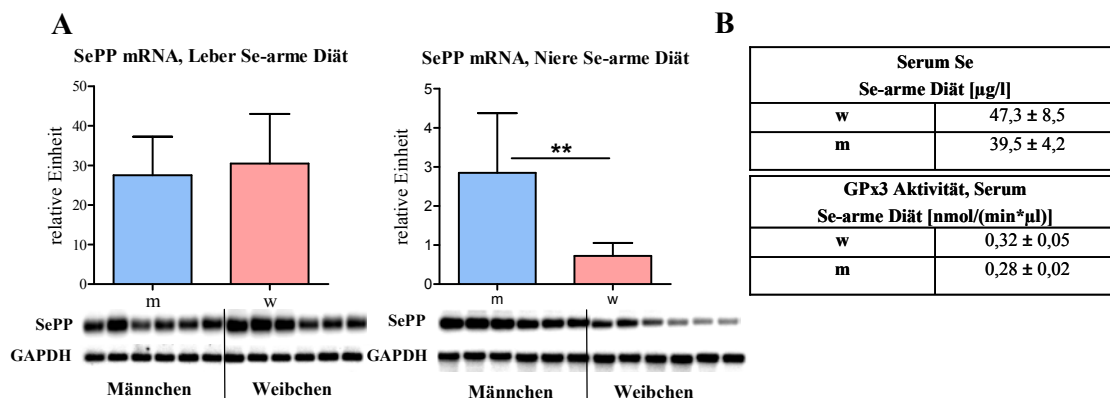


Abb. 3.6 SePP mRNA und Se-Konzentrationen sowie GPx3 Aktivitäten der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse unter defizienter Se-Fütterung. Die SePP mRNA Konzentration war in der männlichen Niere 3,5-fach höher im Vergleich zu den Weibchen (A). Die hepatische SePP mRNA Konzentration, die Serum Se-Spiegel und GPx3 Aktivitäten zeigten keine Geschlechtsunterschiede (A, B).

Interessanterweise waren einerseits unter Se-armer Fütterung Geschlechtsunterschiede wie im Fall der hepatischen SePP Expression und der Serum GPx3 Aktivität nicht mehr feststellbar. Andererseits wurden auch neue bzw. deutlichere geschlechtsspezifische Expressionen sichtbar. Insbesondere die männliche Niere schien stärker durch einen Se-Mangel betroffen. Die renalen GPx Aktivitäten waren im Vergleich zu den Tieren unter Se-suffizienter Fütterung um den Faktor 35 bei Weibchen und 55 bei den Männchen, die TrxR Aktivitäten um 1,3 in weiblichen und 2,6 in männlichen Tieren vermindert. Folglich führte die stärkere Reduktion dieser Enzymaktivitäten in der männlichen Niere zu signifikant niedrigeren GPx- (50%) und TrxR-Aktivitäten (40%) in den Männchen verglichen mit den Weibchen (Abb. 3.7A). Diese Feststellung ist im Einklang mit einer stärkeren Reduktion des renalen Se-Gehaltes in den Männchen (m: 6,3-fach versus w: 3,6-fach; $p < 0,001$; Abb. 3.7B). Somit war die unter Se-Suffizienz beobachtete tendenziell höhere GPx Aktivität in der weiblichen Niere unter Se-Mangelbedingungen signifikant meßbar. Dagegen wiesen die hepatischen GPx Aktivitäten trotz disproportionaler Reduktion um 36-fach in den Männchen und 75-fach in den Weibchen, erneut keine signifikanten Geschlechtsunterschiede auf (Abb. 3.7C). Die TrxR Aktivitäten waren ebenso in beiden Geschlechtern gleich (Leber-w: $2,34 \pm 0,70$, m: $3,45 \pm 0,74$

nmol/(min*mg)). Ferner unterschieden sich die GPx1 mRNA Konzentrationen in Niere und Leber nicht zwischen den Geschlechtern (Abb. 3.7C). Weibchen und Männchen scheinen folglich gewebespezifisch unterschiedlich in ihrer posttranskriptionellen Selenoproteinsynthese auf einen Se-Mangel zu reagieren.

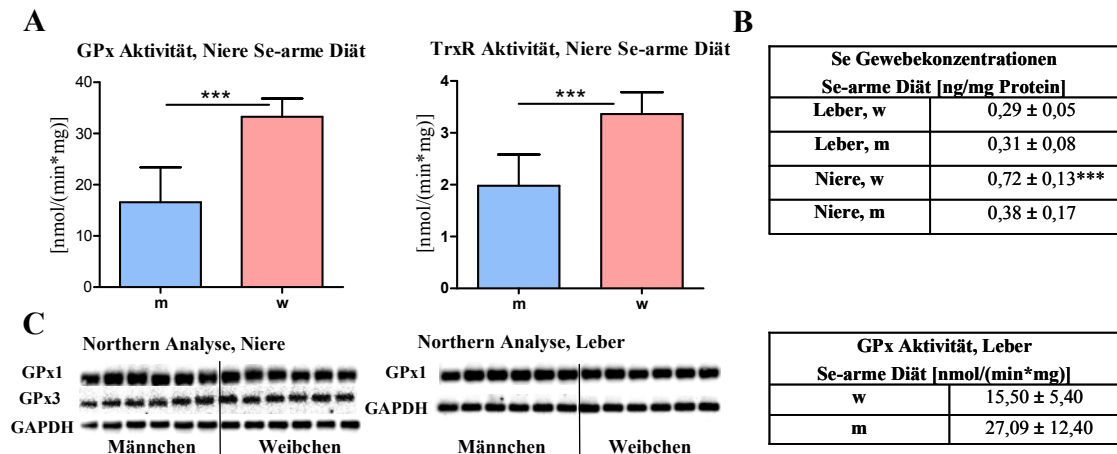


Abb. 3.7 GPx-, TrxR-Aktivitäten und GPx mRNA Konzentrationen sowie Se-Konzentrationen in Niere und Leber der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se-Fütterung. Sowohl die GPx Aktivität (2-fach), die TrxR Aktivität (1,8-fach) als auch Se-Konzentration (2-fach) war in der weiblichen Niere höher als in den Männchen (A, B). Keine signifikanten Geschlechtsunterschiede zeigten sich in den GPx1 und -3 mRNA Konzentrationen in Leber und Niere sowie in der hepatischen Se-Konzentration und GPx Aktivität (B, C).

3.2.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere unter Se-Mangel

Die ausgeprägten Geschlechtsunterschiede bei der hepatischen Dio1 Aktivität unter Se-adäquater Fütterung konnten unter Se-Mangelbedingungen durch eine disproportionale Reduktion dieser Aktivitäten, um den Faktor 2 in Weibchen und 5,6 in Männchen, nicht mehr beobachtet werden (Vergleich Abb. 3.8 mit Abb. 3.3). Allerdings wurde unter Se-Defizienz erneut eine 1,7-fach höhere Dio1 mRNA Konzentration in der weiblichen Leber gemessen. Damit resultiert eine höhere hepatische Dio1 Transkriptmenge der Weibchen in nun gleichen hepatischen Aktivitäten in beiden Geschlechtern. Die unter 3.1.2.1 beschriebene Diskrepanz ist unter Se-Mangel nicht mehr so stark ausgeprägt.

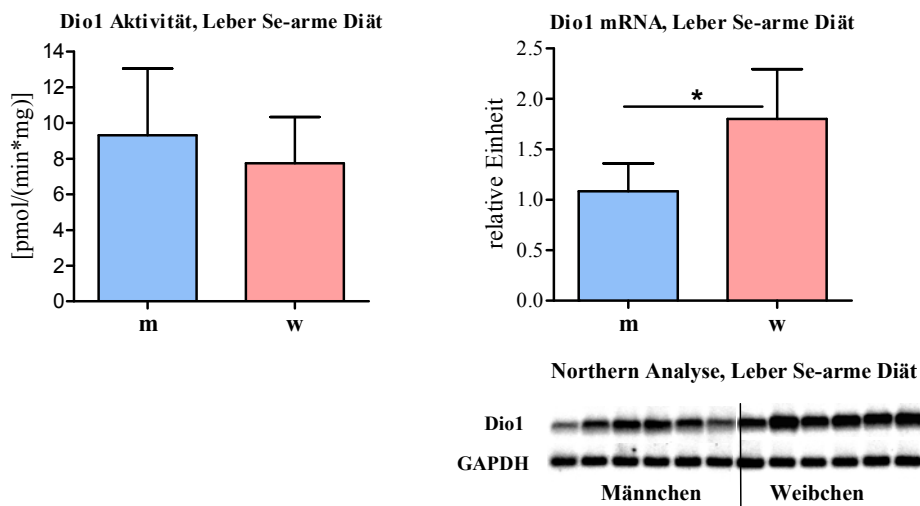


Abb. 3.8 Hepatische Dio1 Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se-Fütterung. Die hepatische Dio1 mRNA Konzentration war in den Weibchen 1,7-fach höher als in den Männchen, die Aktivitäten unterschieden sich jedoch nicht in beiden Geschlechtern.

In der Niere verstärkten sich die unter adäquater Se-Fütterung beobachteten Geschlechtsunterschiede einer höheren Dio1 mRNA Konzentration (4,5-fach) und Dio1 Aktivität (4,2-fach) in den weiblichen Tieren durch die Reduktion der Dio1 Aktivität um ca. 60% in den Männchen (Vergleich Abb. 3.9 mit Abb. 3.3). Die gegenläufige Expression von SePP mRNA Konzentration und Dio1 Aktivität konnte erneut in den Se-armen Nieren, nicht aber in den Se-armen Lebern beobachtet werden (siehe 3.1.2.2).

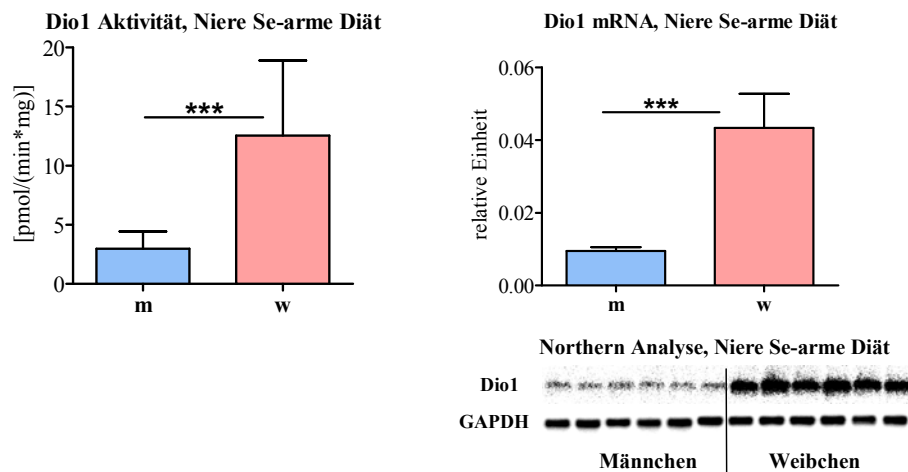


Abb. 3.9 Renale Dio1 Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se-Fütterung. Die renale Dio1 mRNA Konzentration (4,5-fach) und Aktivität (4,2-fach) war in den Weibchen höher als in den Männchen.

3.2.3 Zusammenfassung der Dio1 Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr

Die Abb. 3.10 vergleicht die Dio1 Expression bei Se-adäquater und defizienter Versorgung durch Bildung der Verhältnisse aus Aktivitäten und mRNA Konzentrationen. Dabei wurden die mRNA und Aktivitätswerte der Männchen auf 1,00 gesetzt und die weiblichen Werte relativ auf diese bezogen. In der Niere zeigten die Weibchen sowohl unter Se-suffizienter als auch defizienter Fütterung eine höhere Dio1 Expression. Die mRNA Konzentrationen korrelierten mit den Dio1 Aktivitäten in beiden Geschlechtern, wobei sich die Geschlechtsunterschiede unter Se-Mangel verstärkten. Dagegen war in der Leber bei adäquater Se-Versorgung eine höhere Dio1 Aktivität in Kombination mit einer niedrigeren Dio1 Transkriptmenge in den Männchen messbar, umgekehrt zutreffend für die Weibchen. Unter Se-Mangel war diese Beobachtung weniger stark ausgeprägt. Beide Geschlechter wiesen analoge hepatische Dio1 Aktivitäten auf, bei einer erneut niedrigeren mRNA Konzentration in den Männchen.

	Leber Se-suffizient		Leber Se-defizient		Niere Se-suffizient		Niere Se-defizient	
	m	w	m	w	m	w	m	w
mRNA	1,00	1,42*	1,00	1,80*	1,00	1,53**	1,00	4,55***
Aktivität	1,00	0,36***	1,00	0,83	1,00	1,84***	1,00	4,21***
Aktivität/mRNA	1,00	0,25	1,00	0,46	1,00	1,20	1,00	0,93

Abb. 3.10 Tabellarische Zusammenfassung der Dio1 Expression in Leber und Niere der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter und suffizienter Se-Fütterung. Die Aktivitäten und mRNA Konzentrationen der männlichen Tiere wurden 1,00 gesetzt. Die weiblichen Aktivitäten und mRNA Konzentrationen sind relative Werte in Bezug auf die dazugehörigen männlichen Werte.

3.3 Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit vom Mausstamm bei adäquater Se-Versorgung

Die freundliche Bereitstellung von 90 d alten BALB/c Mäusen durch das Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg ermöglichte mir die Untersuchung der Selenoprotein-Expression in einem weiteren Mausstamm. Die BALB/c Mäuse erhielten einerseits reguläres Futter mit einem durchschnittlichen Se-Gehalt von 0,24 ppm, andererseits Se-defizientes Futter mit einem Se-Anteil von 0,07 ppm (Charakterisierung E unter 2.2/Tab. 2).

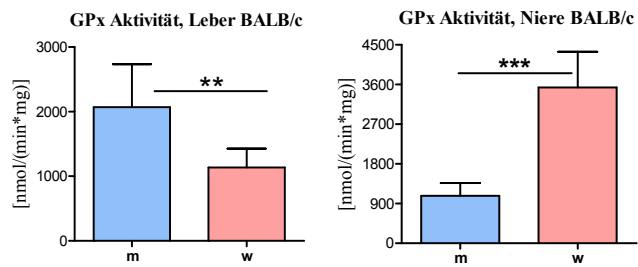
3.3.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentration in Leber, Niere und Serum der BALB/c Mäuse unter adäquater Versorgung mit Se

Die Serum Se-Spiegel zeigten keine Geschlechtsunterschiede und waren größtmäßig im gleichen Bereich wie beim C57Bl/6 Mausstamm einzuordnen (Abb. 3.11A). Trotz ähnlicher Se-Gewebekonzentrationen beider Geschlechter in Leber und Niere, zeigte sich signifikant eine 1,8-fach höhere hepatische und um ca. 70% niedrigere renale GPx Aktivität in den Männchen (Abb. 3.11A). Die dazugehörigen GPx1 mRNA Konzentrationen beider Organe zeigten keinen Geschlechtseinfluss (Abb. 3.11C). Ferner konnte eine 2,2-fach höhere renale GPx3 mRNA Konzentration in den Männchen bei analogen GPx3 Aktivitäten im Serum beider Geschlechter gemessen werden (Abb. 3.11B, C).

Generell waren die GPx3 Aktivitäten der BALB/c Mäuse ca. 50% höher als die GPx3 Aktivitäten in den 60 d alten C57Bl/6 Mäusen (Vergleich Abb. 3.11B mit Wildtyp Mäusen (wt) in 3.23B). Die hepatische SePP Transkriptmenge der BALB/c Mäuse zeigte keine geschlechtsspezifische Abhängigkeit, den Serum Se-Spiegeln entsprechend (Abb. 3.11C). In der Niere war erneut eine 4,3-fach höhere SePP Expression in den Männchen feststellbar ($p < 0,001$; Abb. 3.11C). Die TrxR Aktivitäten in Leber (w: $3,57 \pm 0,47$ versus m: $3,85 \pm 0,86$ nmol/(min*mg)) und Niere (w: $6,99 \pm 1,33$ versus m: $9,52 \pm 2,14$ nmol/(min*mg)) wiesen keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen auf. Unten 3.3.3 aufgeführte Tabelle vergleicht zusammenfassend den C57Bl/6 mit dem BALB/c Mausstamm unter Se-suffizienten Bedingungen.

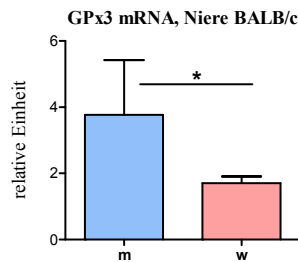
A

Se-Konzentrationen BALB/c [Serum µg/l; Gewebe ng/mg Protein]	
Leber, w	2,7 ± 1,2
Leber, m	3,6 ± 0,6
Niere, w	5,4 ± 1,2
Niere, m	4,2 ± 0,7
Serum, w	354,4 ± 7,7
Serum, m	368,7 ± 10,3



B

GPx3 Aktivität, Serum BALB/c [nmol/(min*µl)]	
w	7,23 ± 2,30
m	5,94 ± 0,77



C

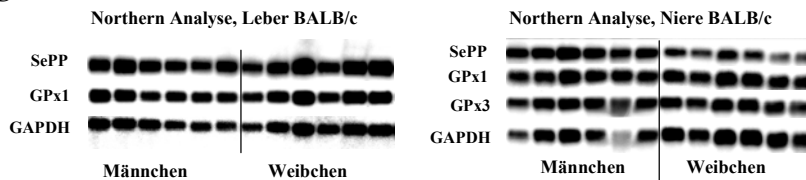


Abb. 3.11 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in den 90 d alten BALB/c Mäusen mit suffizienter Se-Fütterung. Die Se-Konzentrationen in Serum, Leber und Niere zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (A). Die GPx Aktivität der Männchen war 1,8-fach höher in der Leber und 70% niedriger in der Niere im Vergleich zu den Weibchen (A). Die renalen und hepatischen GPx1 Transkriptmengen wiesen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf (C). Die männliche renale GPx3 mRNA Konzentration zeigte einen 2,2-fach höheren Wert im Vergleich zu den Weibchen. Die Serum GPx3 Aktivitäten waren gleich in beiden Geschlechtern (B, C). Die männliche Niere wies eine 4,3-fach höhere SePP Transkriptmenge auf (C; $p < 0,001$). Die Leber zeigte keine Geschlechtsunterschiede in den SePP Transkriptmengen (C).

3.3.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere der BALB/c Mäuse unter adäquater Versorgung mit Se

Erstaunlicherweise konnte für die hepatische Dio1 unter Se-Suffizienz ein anderes Expressionsmuster in den BALB/c Mäusen im Vergleich zum C57Bl/6 Stamm festgestellt werden. Es zeigte sich bei diesen Mäusen eine doppelt so hohe Dio1 Aktivität in der weiblichen Leber im Vergleich zu den Männchen. Allgemein fielen die hepatischen Dio1 Aktivitäten in den BALB/c Mäusen im Vergleich zu den 60 d alten C57Bl/6 Tie-

ren geringer aus, um 1,5-fach in den Weibchen und 5,5-fach in den Männchen. Die hepatischen BALB/c Dio1 mRNA Konzentrationen beider Geschlechter waren gleich (Vergleich Abb. 3.12 mit wt Mäusen in 3.26). In der Niere ließen sich erneut die signifikanten Geschlechtsunterschiede nachweisen (w: $2,0 \pm 1$ versus $0,6 \pm 0,4$ pmol/(min*mg), $p < 0,001$; mRNA, $p < 0,01$), wobei auch hier die Aktivitätswerte im Vergleich zu den C57Bl/6 Mäusen geringer ausfielen (w: 2,8-fach; m: 6,2-fach).

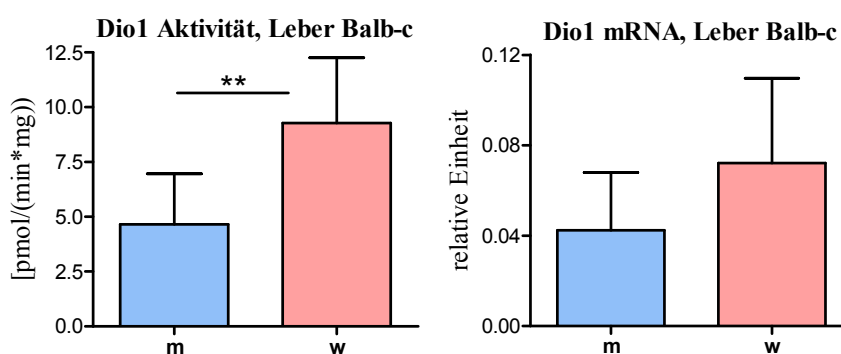


Abb. 3.12 Hepatische Dio1 Expression der 90 d alten BALB/c Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung. Die Weibchen zeigten eine 2-fach höhere Dio1 Aktivität, bei ähnlichen hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen in beiden Geschlechtern.

3.3.3 Zusammenfassender Vergleich der BALB/c mit den C57Bl/6 Mäusen unter adäquater Versorgung mit Se

	Dio1 Leber Aktivität/ mRNA	Dio1 Niere Aktivität/ mRNA	SePP Leber mRNA	SePP Niere mRNA	GPx3 Serum Aktivität/ renale mRNA	GPx1 Leber Aktivität/ mRNA	GPx Niere Aktivität/ mRNA	TrxR Niere; Leber Aktivität
C57Bl/6 60 d alt	♀ < ♂* / ♀ = ♂	♀ > ♂* / ♀ > ♂***	♀ = ♂	♀ < ♂**	♀ = ♂ / ♀ = ♂	♀ = ♂ / ♀ = ♂	♀ = ♂ / ♀ = ♂	♀ = ♂
BALB/c 90 d alt	♀ > ♂** / ♀ = ♂	♀ > ♂*** / ♀ > ♂**	♀ = ♂	♀ < ♂***	♀ = ♂ / ♀ < ♂*	♀ < ♂** / ♀ = ♂	♀ > ♂*** / ♀ = ♂	♀ = ♂

Abb. 3.13 Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 90 d alten BALB/c mit den 60 d alten C57Bl/6 Mäusen unter Se-suffizienter Fütterung (siehe Wildtypdaten unter 3.6). In grüner Farbe sind die Unterschiede in der Selenoprotein-Expression in beiden Stämmen gekennzeichnet.

3.3.4 Vergleich der Selenoprotein-Expression in Se-suffizienten und Se-defizienten BALB/c Mäusen

BALB/c Mäuse unter Se-Defizienz zeigten im Gegensatz zu BALB/c Tieren mit adäquater Se-Versorgung keine Geschlechtsunterschiede in den renalen und hepatischen Dio1 Aktivitäten, bedingt durch eine stärkere Reduktion dieser Werte in den Weibchen (Abb. 3.14). Die mRNA Konzentrationen beider Geschlechter waren analog zu den Tieren unter Se-Suffizienz. Dagegen wurde die SePP mRNA Konzentration und die GPx Aktivität in der Leber unter Se-Defizienz stärker in den Männchen reduziert. Infolgedessen war eine höhere hepatische SePP Transkriptmenge in den Weibchen messbar und die GPx1 Aktivitäten glichen sich unter Se-Mangel in beiden Geschlechtern an. Desweiteren zeigte sich ein geringerer Se-Gehalt in der weiblichen BALB/c Niere und dazu korelierend eine stärkere Reduktion der renalen GPx und TrxR Aktivität in den Weibchen. Somit zeigten die Männchen eine signifikant höhere renale TrxR Aktivität und die GPx Aktivitäten glichen sich in beiden Geschlechtern an.

	Dio1 Leber Aktivität/ mRNA	Dio1 Niere Aktivität/ mRNA	SePP Leber mRNA	SePP Niere mRNA	GPx3 Serum Aktivität/ renale mRNA	GPx1 Leber Aktivität/ mRNA	GPx Niere Aktivität/ mRNA	TrxR Leber/ Niere Aktivität	Se- Gehalt Serum/ Niere/ Leber
BALB/c Se- defizient	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀>♂**	♀>♂**	♀<♂*	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀<♂***	♀=♂ ♀<♂*/ ♀=♂
BALB/c Se- suffizient	♀>♂**/ ♀=♂	♀>♂***/ ♀>♂**	♀=♂	♀<♂***	♀=♂/ ♀<♂*	♀<♂**/ ♀=♂	♀>♂***/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂ ♀=♂/ ♀=♂

Abb. 3.14 Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 90 d alten BALB/c unter Se-suffizienter und Se-defizienter Fütterung. In grüner Farbe sind die Unterschiede in den Selenoprotein-Expressionen zwischen beiden Gruppen gekennzeichnet.

3.4 Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit vom Alter

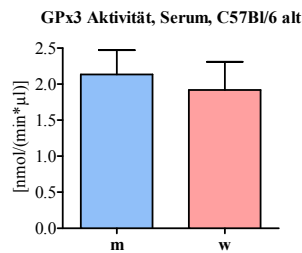
Einige wenige Studien haben bislang eine Abhängigkeit der Selenoprotein-Expression vom Alter analysiert [Ducros et al. 2000(183); Lewin et al. 2001(184)]. Dieses liegt darin begründet, dass die tierexperimentellen Einrichtungen kostenintensiv sind und deshalb selten Langzeitversuche durchgeführt werden. Umso erfreulicher, dass sich für diese Studien die Möglichkeit ergab, die Analysen auf 1 Jahr alte C57Bl/6 Mäuse mit adäquater Se-Versorgung (Charakterisierung F unter 2.2/Tab. 2) auszudehnen.

3.4.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum von 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen

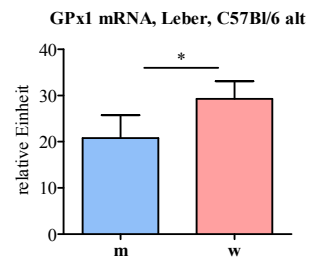
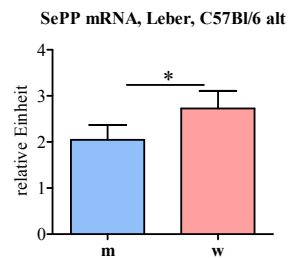
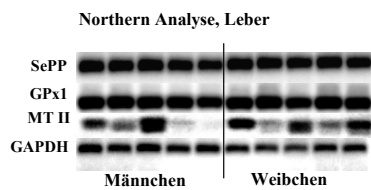
Die Se-Konzentrationen in Niere und Serum der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse mit adäquater Se-Versorgung zeigten keine Geschlechtsunterschiede und die Werte entsprachen denen der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse unter 3.6.1 (Abb. 3.15A). Der Vergleich zu den 35 d alten Tieren ergab doppelt so hohe Se-Gewebekonzentrationen in den älteren Tieren (Vergleich Abb. 3.15A mit Abb. 3.2C). Es konnte kein Geschlechtseinfluss auf die Serum GPx3 Aktivität und die renale GPx3 mRNA Konzentration beobachtet werden (Abb. 3.15A, C). Indes wurde erneut signifikant eine höhere SePP Transkriptmenge in der weiblichen Leber (1,3-fach) und eine größere SePP mRNA Konzentration in der männlichen Niere (1,7-fach) gemessen (Abb. 3.15B, C). Interessanterweise zeigten sich aber in den alten Mäusen eine geschlechtsspezifische Expression der hepatischen GPx mit einer höheren GPx Aktivität (25%) und GPx1 mRNA Konzentration (40%) in den weiblichen Tieren (Abb. 3.15B, D). Passend dazu war auch die Se-Konzentration in der weiblichen Leber signifikant höher. Die renale GPx Expression als auch die TrxR Aktivitäten in Leber und Niere waren analog in beiden Geschlechtern (Abb. 3.15C, D).

A

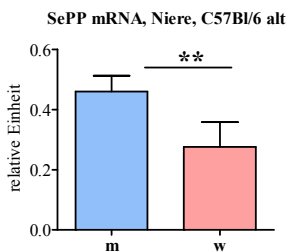
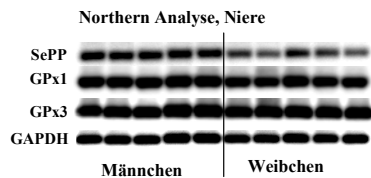
Se-Konzentrationen, C57Bl/6 alt [Serum µg/l; Gewebe ng/mg Protein]	
Leber, w	4,7 ± 0,6 *
Leber, m	3,9 ± 0,4
Niere, w	5,3 ± 1,3
Niere, m	4,3 ± 0,7
Serum, w	322,5 ± 53,4
Serum, m	376,9 ± 81,2



B



C



D

TrxR Aktivitäten, C57Bl/6 alt [nmol/(min*mg)]			
Leber, w	6,07 ± 0,41 *	Niere, w	6,91 ± 1,83
Leber, m	5,46 ± 0,32	Niere, m	5,27 ± 0,53

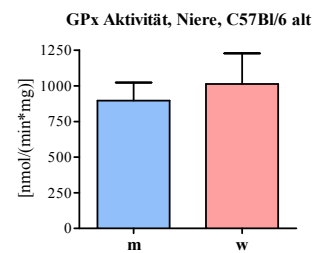
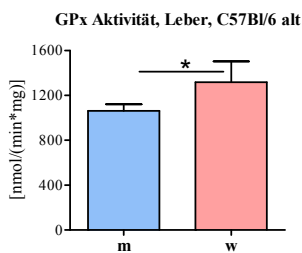


Abb. 3.15 Selenoprotein-Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Se-Konzentrationen in Serum, Niere als auch die GPx3 Expression zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (A, C). Die SePP Transkriptmenge war höher in der weiblichen Leber (1,3-fach) und in der männlichen Niere (1,7-fach; B, C). Ebenso zeigte sich eine erhöhte GPx Aktivität (25%) sowie GPx1 mRNA Konzentration (40%) und Se-Konzentration in der weiblichen Leber (B, D). Die renale GPx Expression und die TrxR Aktivitäten waren gleich in beiden Geschlechtern (C, D).

3.4.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse

In den 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen ließ sich der ausgeprägte Geschlechtseinfluss auf die renale Dio1 Expression ebenfalls nachweisen. Die Weibchen zeigten im Vergleich zu den männlichen Tieren eine 2,5-fach höhere Dio1 Aktivität und entsprechend eine 4,4-fach höhere Dio1 mRNA Konzentration in der Niere ($p < 0,01$; Abb. 3.16). Dabei war die renale männliche Dio1 Aktivität 1,7-fach höher und die weibliche renale Dio1 Aktivität 3,3-fach höher im Vergleich zu den 60 d alten C57Bl/6 Mäusen (Vergleich Abb. 3.16 mit wt Mäusen in Abb. 3.26). Die Dio1 Aktivitäten und mRNA Konzentrationen in der Leber waren zwischen den Geschlechtern ähnlich (Abb. 3.16). Die Männchen zeigten eine Reduktion der hepatischen Dio1 Aktivität mit dem Alter um ca. 50% (Vergleich Abb. 3.16 mit wt Mäusen in Abb. 3.26). Folglich waren die signifikanten Geschlechtsunterschiede in den 60 d alten Mäusen mit einer höheren Aktivität in den männlichen Lebern in den 1 Jahr alten Tieren nicht mehr feststellbar. Die gegenläufige Regulation der SePP mRNA und der Dio1 Aktivität, wie unter 3.1.2.2 beschrieben, ist bei den alten Tieren nur in der Niere zu beobachten. Hohe Dio1 Aktivitäten gingen mit niedrigeren SePP Transkript Konzentrationen in der weiblichen Niere einher.

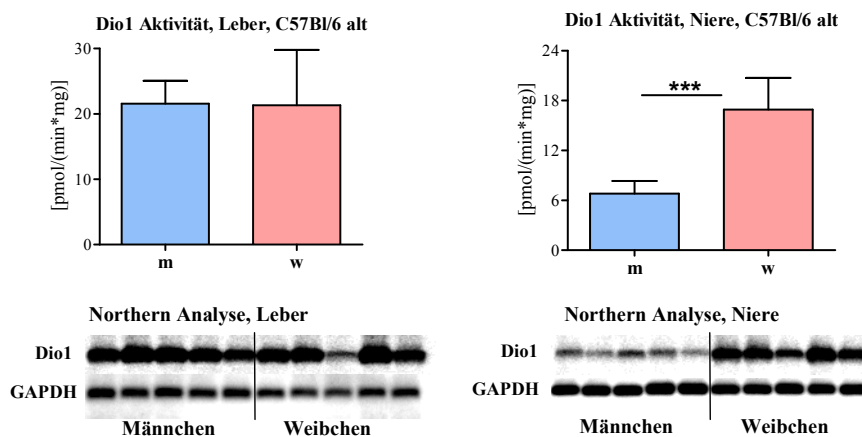


Abb. 3.16 Dio1 Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. In der Niere zeigten die Weibchen eine 2,5-fach höhere Dio1 Aktivität und eine 4,4-fach höhere mRNA Konzentration ($p < 0,01$). Die hepatischen Dio1 Aktivitäten und mRNA Konzentrationen waren analog zwischen den Geschlechtern.

3.4.3 Zusammenfassender Vergleich der 1 Jahr alten Mäuse mit den 60 d und den 35 d alten Mäusen unter adäquater Versorgung mit Se

	Dio1 Leber Aktivität/ mRNA	Dio1 Niere Aktivität/ mRNA	SePP Leber mRNA	SePP Niere mRNA	GPx3 Serum Aktivität/ renale mRNA	GPx1 Leber Aktivität/ mRNA	GPx Niere Aktivität/ mRNA	TrxR Niere/ Leber Aktivität	Se- Gehalt Serum/ Leber/ Niere
C57Bl/6 1 Jahr alt	♀=♂/ ♀=♂	♀>♂***/ ♀>♂**	♀>♂*	♀<♂**	♀=♂/ ♀=♂	♀>♂*/ ♀>♂*	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀>♂*	♀=♂/ ♀>♂*/ ♀=♂
C57Bl/6 60 d alt	♀<♂*/ ♀=♂	♀>♂*/ ♀>♂***	♀=♂	♀<♂**	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂/ ♀=♂
C57Bl/6 35 d alt	♀<♂***/ ♀>♂*	♀>♂***/ ♀>♂**	♀>♂***	♀<♂***	♀>♂*/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂	♀=♂/ ♀=♂/ ♀=♂

Abb. 3.17 Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen mit den 60 d und 35 d alten C57Bl/6 Mäusen unter Se-suffizienter Fütterung (Mausdaten siehe 3.1 und 3.6). In grüner Farbe sind die Unterschiede in der Selenoprotein-Expression gekennzeichnet.

3.5 Einfluss von Kastration oder Ovariectomie auf die Selenoprotein-Expression im C57Bl/6 Mausmodell

Die Entfernung der Gonaden als Hauptsyntheseorgane der Geschlechtshormone ermöglicht die Untersuchung des Einflusses von Östrogenen und Androgenen auf die Selenoprotein-Expression. Die Analyse erfolgte mittels Vergleich kastrierter C57Bl/6 Männchen (kas) mit schein-operierten männlichen Tieren (sham). Die Weibchen wurden ovariectomiert (ovx) und die Hälfte dieser mit einer täglichen Injektion von 200 ng Estradiol über 6 Tage injiziert (ovx+E2) (Charakterisierung D unter 2.2/Tab. 2). Aktivitäten und mRNA Konzentrationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent angegeben, wobei die Werte der schein-operierten Männchen und der ovariectomierten Weibchen mit E2 Gabe auf 100% gesetzt wurden. Die Aktivitäten und Transkriptmengen der ovx und kastrierten Tiere sind als relative Prozentangaben bezogen auf die Werte der ovx+E2 und der schein-operierten Kontrollgruppe angegeben.

3.5.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in Leber, Niere und Serum

Eine Kastration, eine Ovariectomie oder eine Ovariectomie in Kombination mit einer E2 Gabe verursachten keine Veränderungen der Se-Konzentrationen in den Seren, Lebern oder Nieren (Abb. 3.18A). Die hepatischen SePP mRNA Konzentrationen waren ebenfalls unbeeinflusst durch eine Entfernung der Gonaden (Abb. 3.18B). In der Niere zeigte sich erneut beim Vergleich der schein-operierten Männchen mit den ovx Weibchen mit E2 Gabe eine 2-fach erhöhte SePP mRNA Konzentration in den Männchen, wie unter 3.1.1 erwähnt ($p < 0,001$; Abb. 3.18C). Eine Kastration bewirkte eine Reduktion der renalen SePP mRNA Konzentration um 75% in den männlichen Tieren (Abb. 3.18C). Eine Ovariectomie zeigte keinerlei Auswirkung auf die renale SePP mRNA Konzentration.

Mittels RT-PCR wurden signifikante Reduktionen der hypophysären Transkriptmengen an Wachstumshormon (GH), Glykoproteinhormon alpha Untereinheit (GPH) und an Prolaktin in den kastrierten Männchen gemessen. Da die Expression von GH und GPH in der Hypophyse positiv durch Testosteron beeinflusst wird [Sinha et al. 1979(185)], bedingt eine Kastration die Reduktion der mRNA Konzentrationen (Abb. 3.18D). FSH und LH sind Gene, die in der Hypophyse durch einen negativen Estradiol Feedback reguliert werden. Eine Ovariectomie reduziert die E2 Konzentration, infolge bleibt der negative Feedback aus und beide hypophysären mRNA Konzentrationen müssten akut ansteigen [Parkening et al. 1982(186); Xu et al. 2000(187)]. Eine Reduktion der mittleren CT-Werte lässt einen tendenziellen Anstieg beider Transkriptmengen in den Hypophysen ovariectomierter Weibchen vermuten, allerdings wurde dies zum Zeitpunkt der Analyse der Tiere nicht mehr festgestellt. Indes reduzierte eine Ovariectomie signifikant die Prolaktin mRNA Konzentration in der weiblichen Hypophyse, da der positive Stimulus via E2 ausblieb [Parkening et al. 1982(186); Saade et al. 1989(188)]. Die inflammatorischen Parameter TNF alpha (Tumornekrose Faktor alpha), IL-6 (Interleukin 6) und IL-1beta (Interleukin 1beta) zeigten keine Unterschiede zwischen kastrierten und schein-operierten Männchen als auch ovx und ovx+E2 Weibchen (Abb. 3.18D). Damit wiesen weibliche und männliche Mäuse die gleichen inflammatorischen Zustände auf bzw. es wurde keine Entzündung in diesen Mäusen festgestellt und damit sind die durchgeführten Operationen als fachgerecht und ausgeheilt einzustufen.

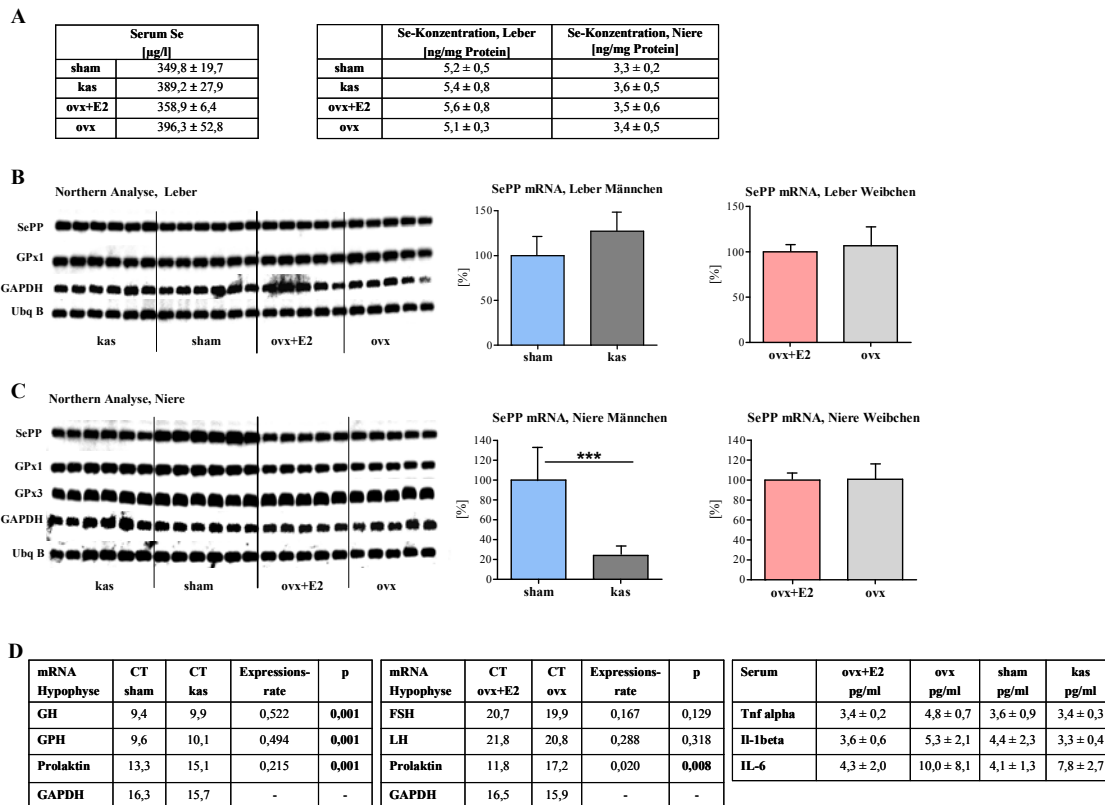


Abb. 3.18 Selenoprotein-Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Se-Konzentrationen in Serum, Niere, Leber als auch die hepatischen SePP mRNA Konzentrationen zeigten keinen Einfluss durch eine Kastration (kas) oder eine Ovariectomie (ovx) mit oder ohne E2 Gabe (ovx+E2; A, B). In der männlichen Niere wurde die SePP mRNA Konzentration durch eine Kastration um ca. 75% reduziert. Eine Ovariectomie bewirkte keine Veränderungen (C). Die GPx1 und GPx3 mRNA Konzentrationen blieben in kastrierten und ovariectomierten Tieren mit oder ohne E2 Verabreichung unverändert (B, C). RT Ergebnisse zeigten reduzierte mRNA Konzentrationen des Wachstumshormons (GH), der alpha Untereinheit des Glykoprotein-hormons (GPH) und des Prolaktins in den Hypophysen kastrierter Männchen (D). In der weiblichen Hypophyse war nur eine signifikante Reduktion der Prolaktin Transkriptmenge in den ovariectomierten Tieren feststellbar. FSH (Follikel Stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) mRNA Konzentrationen waren zu dem Zeitpunkt der Analysen durch eine Ovariectomie nicht beeinflusst. Inflammatorische Parameter, wie TNF alpha (Tumornekrose Faktor alpha), IL-6 (Interleukin 6) und IL-1beta (Interleukin 1beta) zeigten keine Unterschiede zwischen kastrierten und schein-operierten Männchen als auch ovx und ovx+E2 Weibchen (D).

Eine Kastration reduzierte sowohl die GPx3 Aktivität als auch die renale GPx3 mRNA Konzentration auf 70% der Kontrollwerte (sham: $5,2 \pm 0,8$ versus kas: $3,7 \pm 0,3$ nmol/(min*µl); Abb. 3.19A). Veränderungen durch eine Ovariectomie traten nicht ein

(ovx+E2: $4,8 \pm 0,5$ versus ovx: $4,3 \pm 0,2$ nmol/(min* μ l). Ebenfalls ließen sich keine Unterschiede in den GPx1 mRNA Konzentrationen und den GPx Aktivitäten in Niere und Leber der kastrierten und ovariectomierten Mäuse beobachten (Abb. 3.18B, C; 3.19B). Dies bestätigt die schon unter 3.1.1 festgestellte geschlechtsunabhängige hepatische und renale GPx1 Expression bei Se-suffizienter Fütterung in den C57Bl/6 Mäusen. Ebenfalls zeigten sich keine Veränderungen in den hepatischen und renalen TrxR Aktivitäten durch eine Kastration oder Ovariectomie (Leber-ovx+E2: $6,25 \pm 1,04$ versus ovx: $5,64 \pm 0,42$; sham: $5,45 \pm 0,70$ versus kas: $5,64 \pm 0,53$ nmol/(min*mg); Niere-ovx+E2: $3,36 \pm 0,65$ versus ovx: $2,98 \pm 0,53$; sham: $3,67 \pm 0,44$ versus kas: $3,42 \pm 0,18$ nmol/(min*mg)).

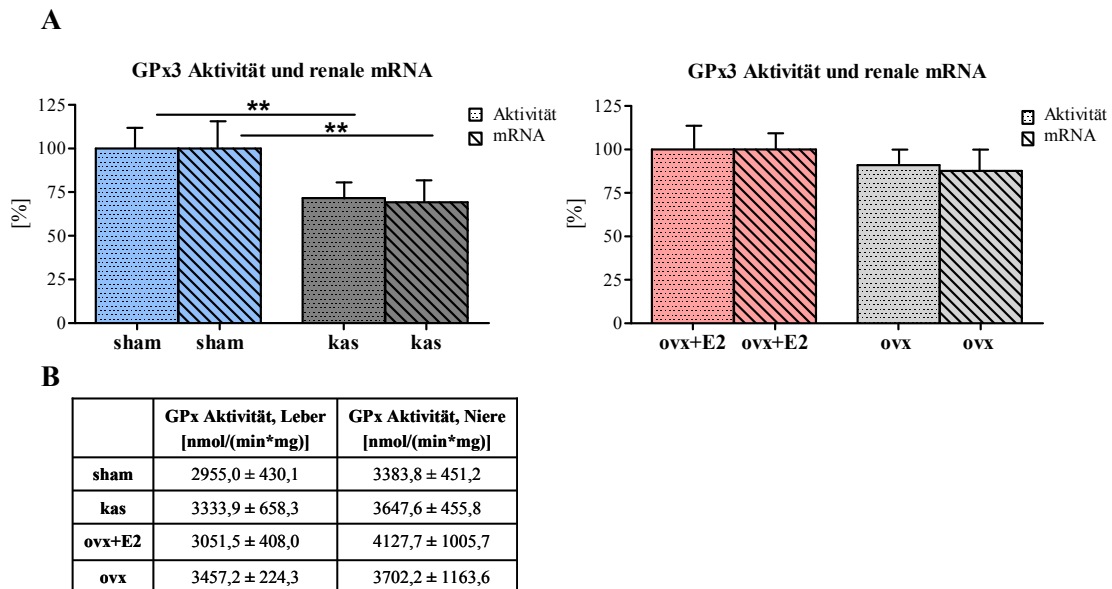


Abb. 3.19 GPx Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Eine Kastration bewirkte eine Reduktion der Serum GPx3 Aktivität und der renalen mRNA Konzentration um ca. 30%. Keine Veränderungen traten in ovariectomierten Tieren mit oder ohne E2 auf (A). Die GPx Aktivitäten der Niere und der Leber waren unbeeinflusst durch eine Ovariectomie oder eine Kastration (B).

3.5.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere

In den 60 d alten C57Bl/6 Mäusen war keine signifikante Veränderung der hepatischen Dio1 mRNA Konzentration und Aktivität durch eine Kastration messbar (sham: $26,9 \pm 5,4$ versus kas: $21,2 \pm 4,5$ pmol/(min*mg); Abb. 3.20). Indessen verursachte eine Ovariectomie einen Anstieg der hepatischen Dio1 Aktivität um 40% in den Weibchen, welcher durch die Estradiolgabe aufgehoben wurde (ovx+E2: $26,9 \pm 4,7$ versus ovx: $37,7 \pm 4,8$ pmol/(min*mg)). Diese höhere Dio1 Aktivität in den ovariectomierten Weibchen erwies sich ebenfalls als signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Dio1 Aktivitäten der schein-operierten und kastrierten Männchen ($p < 0,05$). Die hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen der ovariectomierten Mäuse und ovariectomierten Tiere mit E2 Gabe waren nicht signifikant unterschiedlich. Estradiol scheint im Fall der hepatischen Dio1 posttranskriptional dessen Expression zu beeinflussen.

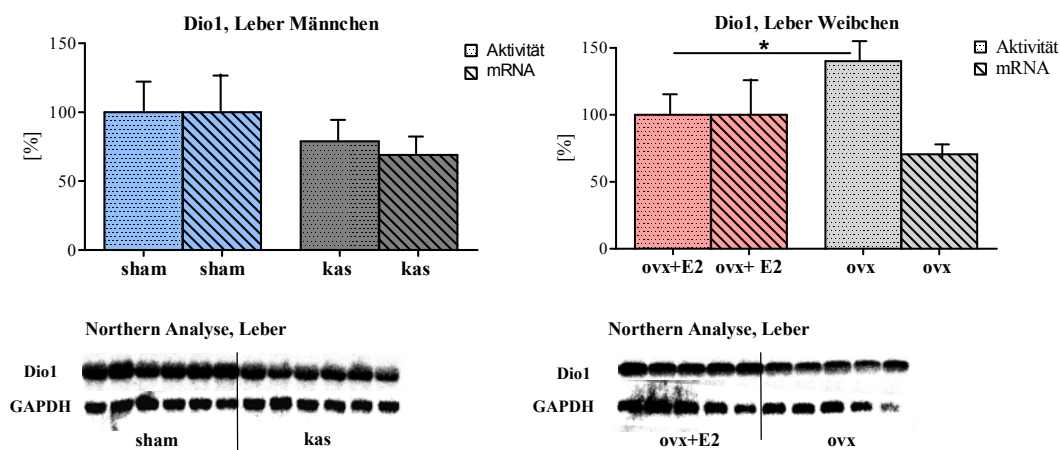


Abb. 3.20 Dio1 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. In der Leber induzierte eine Ovariectomie einen Anstieg der Dio1 Aktivität, eine Kastration hatte keine Auswirkungen. Kastration und Ovariectomie hatten keinen Einfluss auf die hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen.

Die renale Dio1 Expression hingegen scheint auf transkriptioneller Ebene durch Estradiol reguliert zu werden. Eine Ovariectomie induzierte, bei unveränderter renaler Dio1 Aktivität, eine Reduktion der Dio1 mRNA Konzentration im Vergleich zu den ovariectomierten Weibchen mit E2 Gabe (ovx+E2: $9,0 \pm 4,3$ versus ovx: $8,6 \pm 2,9$ pmol/(min*mg); Abb. 3.21). Diese reduzierte mRNA Konzentration der ovx Weibchen

war dennoch signifikant höher als die renale Dio1 Transkriptmenge der Männchen ($p < 0,01$). Eine Kastration verursachte keine Veränderungen der renalen Dio1 mRNA Konzentrationen und Dio1 Aktivitäten (sham: $6,0 \pm 1,8$ versus kas: $8,6 \pm 2,7$ pmol/(min*mg)). Die hepatische Dio2 Expression blieb unverändert niedrig nach einer Ovariectomie oder Kastration (sham: $1,0 \pm 0,4$ versus kas: $1,0 \pm 0,7$ pmol/(min*mg)); ovx+E2: $0,7 \pm 0,4$ versus ovx: $0,6 \pm 0,7$ pmol/(min*mg)).

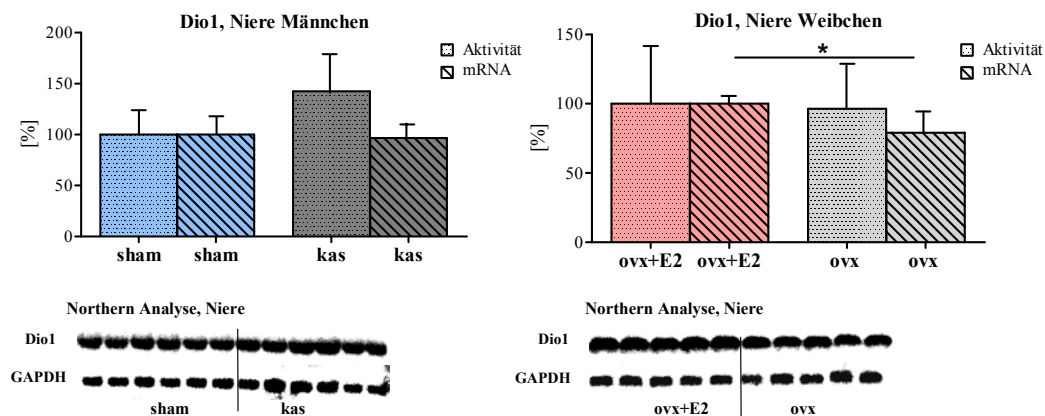


Abb. 3.21 Dio1 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Eine Ovariectomie bewirkte in der Niere, bei unveränderter Dio1 Aktivität, eine Reduktion der Dio1 mRNA Konzentration. Eine Kastration hatte keinen Einfluss auf die renale Dio1 Expression.

3.6 Geschlechtsunterschiede in der Selenoprotein-Expression in der SePP Knock-out Maus

Die SePP Knock-out Mäuse (SePP-KO) wurden unter überdurchschnittlich hoher Se-Zufuhr gehalten (0,32 ppm), damit sie nicht die starken Se-Mangelsymptome entwickelten, und in einem Alter von 60 d getötet (Charakterisierung C unter 2.2/Tab. 2). Bedingt durch die suffiziente Se-Versorgung zeigten die SePP-KO Tiere nicht den unter 1.4.3 beschriebenen charakteristischen Phänotyp. Unter diesen Bedingungen unterschieden sich die Körpergewichte der SePP-KO Tiere nicht zu den heterozygoten (het) und Wildtyp-Tieren (wt) gleichen Geschlechts (Abb. 3.22). Generell wiesen het und wt-Weibchen ca. 25% geringere Gewichte als die Männchen gleichen Genotyps auf. Diese Gewichtsunterschiede zeigten sich indes nicht bei den SePP-KO Tieren.

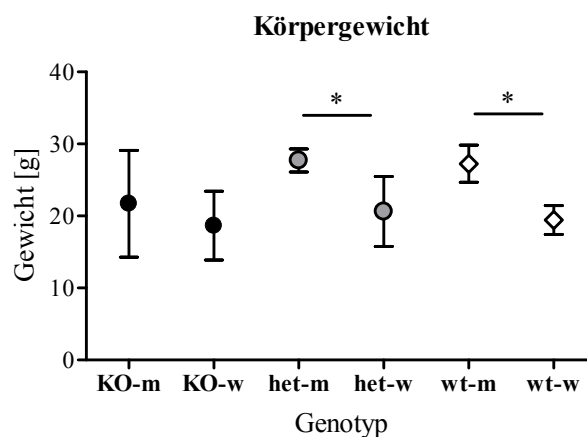


Abb. 3.22 Körpergewichte der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Körpergewichte waren zwischen SePP-KO, heterozygoten (het) und Wildtyp (wt) Mäusen ähnlich. Heterozygote- (het-w) und Wildtyp-Weibchen (wt-w) zeigten signifikant ca. 25% geringere Körpergewichte als die Männchen gleichen Genotyps (m). Interessanterweise ähnelten sich die Gewichte der SePP-KO Mäuse unabhängig vom Geschlecht auf dem Weibchen-typischen Niveau.

3.6.1 Selenoprotein-Expression und Se-Konzentration in Leber, Niere und Serum der SePP-KO Maus

Entgegen der Erwartungen wurden in diesen Tieren keine unterschiedlichen Se-Konzentrationen zwischen wt-, het- und SePP-KO Lebern und Nieren beobachtet (Abb. 3.23A). Die Serum Se-Spiegel entsprachen den in [Schomburg et al. 2003(26)] gemes-

senen Se-Konzentrationen und zeigten ebenso eine 4-5-fache Abnahme vom wt- zum SePP-KO Tier in beiden Geschlechtern (Abb. 3.23C). Ferner wurde in diesen C57Bl/6 Mäusen die GPx3 Aktivität im Serum als auch die renale GPx3 Transkriptmenge weder durch das Geschlecht noch durch den Genotyp beeinflusst (Abb. 3.23B, D).

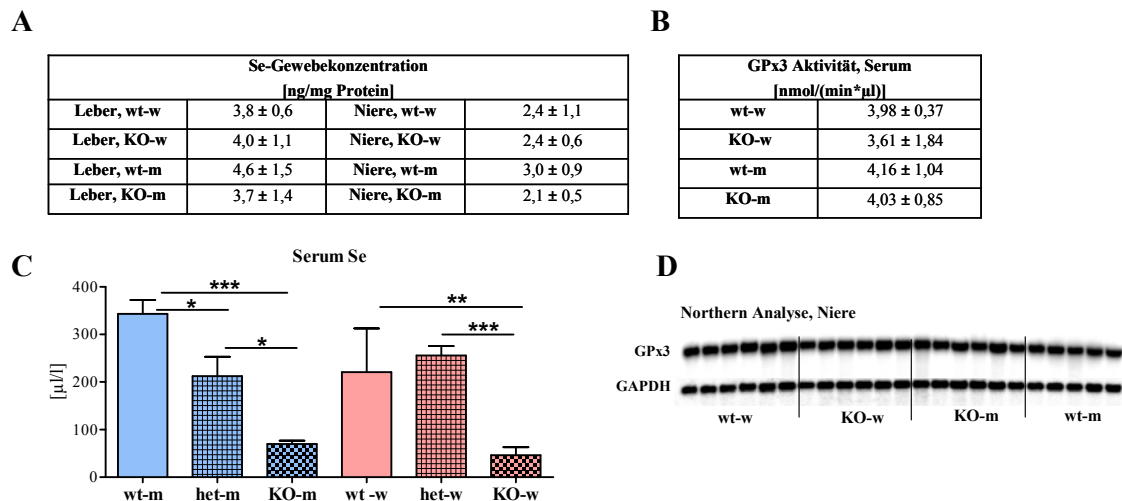


Abb. 3.23 Se-Konzentrationen und GPx3 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die Se-Konzentrationen in Leber und Niere, die Serum GPx3 Aktivitäten als auch die renalen GPx3 mRNA Konzentrationen waren gleich in wildtyp (wt), heterozygot (het) und SePP-KO (KO) Tieren als auch in Weibchen (w) und Männchen (m) (A, B, D). Die Serum Se-Spiegel zeigten signifikant eine Abnahme vom wt- über den het- zum SePP-KO Tier in beiden Geschlechtern, wobei bei den Weibchen kein signifikanter Unterschied zwischen wt und het messbar war (C).

Northern Blot Analysen der hepatischen und renalen SePP mRNA Konzentrationen zeigten gleiche Werte in het- und wt-Tieren (Abb. 3.24A). Irrtümlicherweise als unkorrekt genotypisierte SePP-KO Mäuse (unerwartete SePP Bande im Northern Blot) flossen nicht in die Auswertung mit ein. Wt-Männchen und Weibchen exprimierten hepatisches SePP in ähnlichen Größenordnungen (Abb. 3.24B), was mit den Serum Se-Spiegeln beider Geschlechter übereinstimmte (Abb. 3.23C). Dagegen zeigte sich in der Niere erneut eine 4,5-fache höhere SePP mRNA Konzentration in den männlichen Wildtypmäusen verglichen mit weiblichen Wildtypmäusen (Abb. 3.24B, $p < 0,01$).

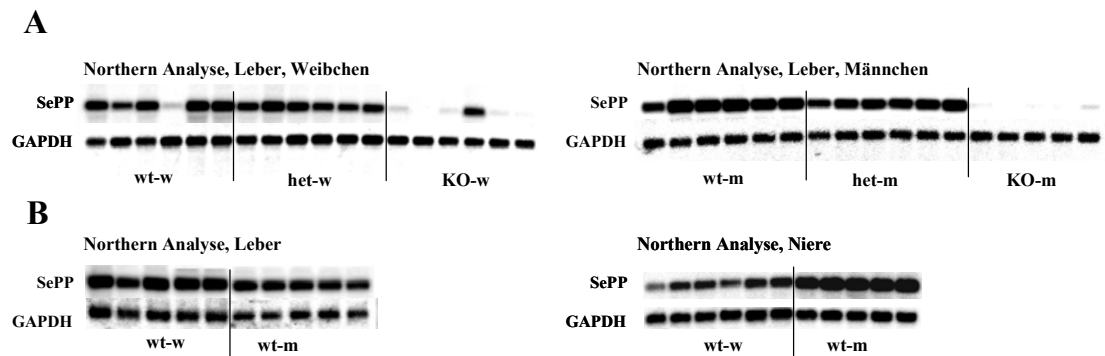


Abb. 3.24 SePP mRNA Konzentrationen in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. In Leber und Niere waren die SePP mRNA Transkriptmengen zwischen Wildtyp (wt) und Heterozygoten (het) beider Geschlechter ähnlich (A). Die hepatische SePP Expression zeigte keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern (B), die renale SePP mRNA Konzentration war 4,5-fach höher in den Wildtypmännchen (wt-m) im Vergleich zu den wt-Weibchen (wt-w) ($p < 0,01$; B).

GPx Aktivitäten, Proteinmengen als auch GPx1 mRNA Konzentrationen zeigten keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen sowie den 3 Genotypen in der Leber (Abb. 3.25A, B, C). Ebenso waren keine Veränderungen hinsichtlich des Geschlechts als auch des Genotyps in den TrxR Aktivitäten feststellbar (Abb. 3.25C, D). In der Niere zeigte sich eine Reduktion der GPx Aktivität in den männlichen SePP-KO Tieren um ca. 30% im Vergleich zu den wt-Männchen, bei gleichen GPx1 und GPx3 Transkriptmengen in den verschiedenen Genotypen (Abb. 3.25A, D; 3.23D).

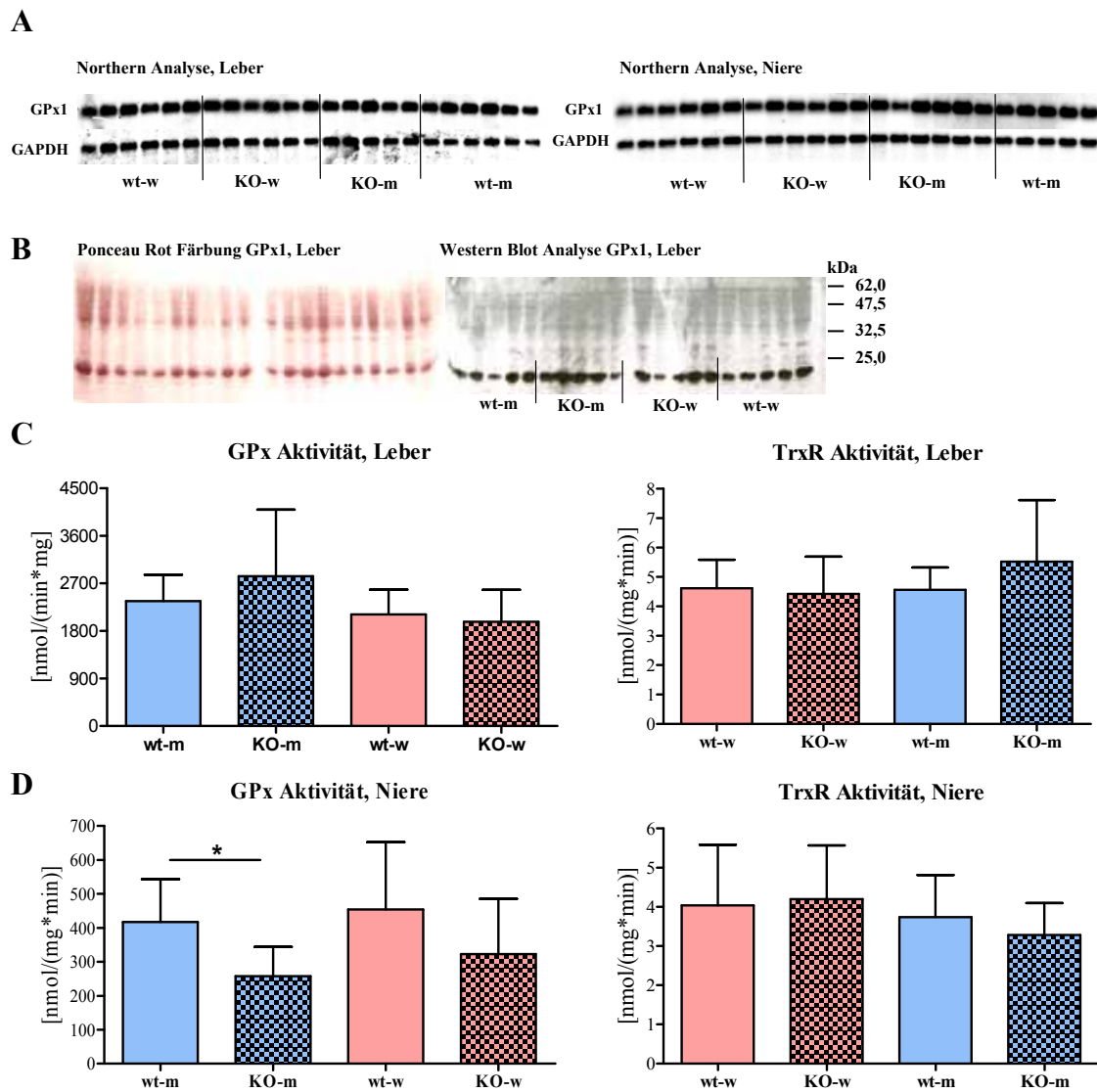


Abb. 3.25 GPx und TrxR Expression in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die GPx Aktivitäten, Proteinmengen als auch GPx1 mRNA Konzentrationen in der Leber waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Genotypen als auch den Geschlechtern (A, B, C). Es wurde eine ca. 30%-ige Reduktion der renalen GPx Aktivität im SePP-KO Tier im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, bei gleichen renalen GPx1 Transkriptmengen (A, D). Die TrxR Aktivitäten zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Genotyp und Geschlecht (C, D).

3.6.2 Expression der Deiodasen in Leber und Niere der SePP-KO Maus

Für die Aktivitäten der Deiodasen in Leber und Niere sind annähernd die gleichen Geschlechtseinflüsse zu beobachten, wie unter 3.1.2 beschrieben. Es zeigte sich signifikant

eine höhere hepatische Dio1 Aktivität im SePP-KO (2-fach) und im wt-Männchen (1,5-fach; Abb. 3.26). Dabei war der Geschlechtsunterschied in den hepatischen Dio1 Aktivitäten, durch eine tendenziell höhere männliche Dio1 Aktivität, stärker in den SePP-KO Tieren ausgeprägt. Unterschiede hinsichtlich des Genotyps waren nicht erkennbar. Ebenfalls waren die Dio1 mRNA Konzentrationen bezüglich des Geschlechts und des Genotyps nicht signifikant unterschiedlich. Die Männchen scheinen auch in diesen Mäusen die hepatische Dio1 effizienter zu exprimieren, da aus gleichen Transkriptmengen in beiden Geschlechtern höhere hepatische Dio1 Aktivitäten in den Männchen resultieren (Vergleich unter 3.1.2.1).

In der Niere war eine höhere Dio1 Aktivität sowohl im wt- (1,5-fach), het- (2,4-fach, $p < 0,001$) als auch im SePP-KO Weibchen (1,7-fach) festzustellen (Abb. 3.26). Diese korrelierte mit einer höheren mRNA Konzentration in der weiblichen wt- (2,4-fach; $p < 0,001$) und SePP-KO Niere (3,2-fach; $p < 0,001$). Keine Geschlechts- und Genotypeinflüsse ließen sich für die hepatischen Dio 2 Aktivitäten beobachten (wt-w: $0,19 \pm 0,14$; SePP-KO-w: $0,17 \pm 0,06$; wt-m: $0,23 \pm 0,23$; SePP-KO-m: $0,22 \pm 0,17$ pmol/(min*mg)).

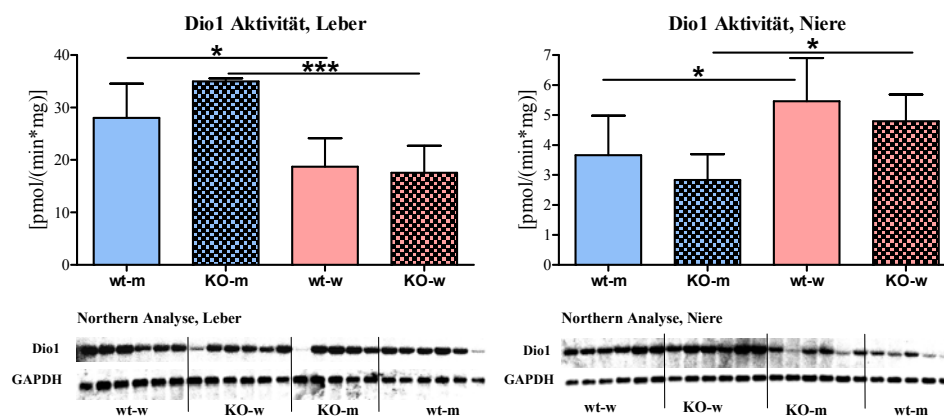


Abb. 3.26 Dio1 Expression in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die hepatischen Dio1 Aktivitäten waren signifikant höher in den männlichen Tieren, um ca. 1,5-fach im Wildtyp (wt-m) und ca. 2-fach in der SePP-KO Maus (KO-m). Unterschiede hinsichtlich Genotyp und Geschlecht in den hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen waren nicht messbar. In der Niere zeigte sich eine höhere Dio1 Aktivität im weiblichen Wildtyp (1,5-fach) und SePP-KO (1,7-fach) und entsprechend erhöhte mRNA Konzentration in Wildtyp (2,4-fach) und SePP-KO Weibchen (3,2-fach, $p < 0,001$). Unterschiede in der Dio1 Expression hinsichtlich des Genotyps konnte in der Niere nicht festgestellt werden.

3.6.3 Selenoprotein-Expression in der Schilddrüse der SePP-KO Maus

In der Schilddrüse ließen sich auch bei diesen Mäusen keine Geschlechts- und Genotypunterschiede in den GPx Aktivitäten messen (Abb. 3.27). Die unter 3.1.3 erwähnte höhere Dio1 Aktivität in den Männchen wurde nur tendenziell beobachtet ($p=0,08$). Interessanterweise zeigte sich, dass weibliche Heterozygote um 70% höhere und männliche Heterozygote 2-fach höhere Dio1 Aktivitäten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp aufwiesen, sich aber nicht signifikant vom SePP-KO Tier unterschieden. Eine solche Induktion der Dio1 der Schilddrüse in den het-Mäusen kann durch den partiellen Se-Mangel des Gewebes erklärt werden, denn ein solcher Effekt wurde bereits in nahrungsbedingten Se-armen Nagern beschrieben [Beech et al. 1995(189)].

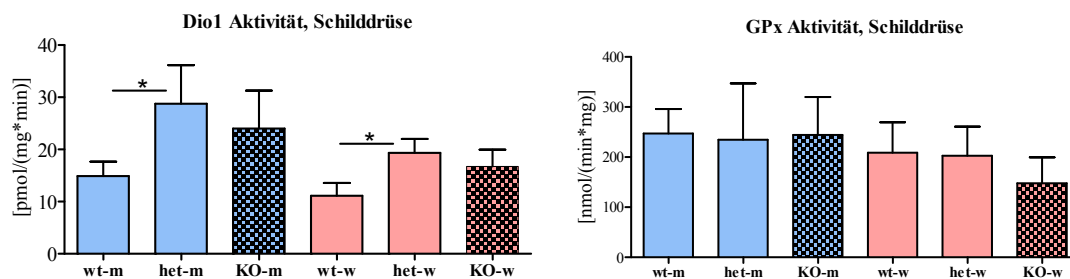


Abb. 3.27 Dio1 und GPx Aktivitäten in der Schilddrüse der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. In der Schilddrüse waren höhere Dio1 Aktivitäten in den heterozygoten Tieren beider Geschlechter im Vergleich zum Wildtypen messbar. Es waren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu beobachten. Der Genotyp als auch das Geschlecht hatten keinen Einfluss auf die GPx Aktivität in der Schilddrüse.

3.7 Mögliche Ursachen für die geschlechtsspezifische Selenoprotein-Expression im C57Bl/6 Mausmodell

Die Komplexität der Selenoprotein-Translationsmaschinerie erlaubt eine Vielzahl von theoretischen Einflussmöglichkeiten durch Geschlechtshormone. Eine unterschiedliche Expression der Se-spezifischen Translationsfaktoren durch Androgene oder Östrogene als mögliche Ursache für den beobachteten Geschlechtsdimorphismus einiger Selenoproteine, insbesondere der Dio1 und SePP, wäre denkbar. Erst kürzlich konnte z.B. gezeigt werden, dass Mutationen im humanen SBP2 Gen Veränderungen der Selenoproteinsynthese bewirken und damit den Schilddrüsenhormonmetabolismus beeinflussen

[Dumitrescu et al. 2005(*110*)]. Zur Analyse des Einflusses von Geschlechtshormonen auf die Translations-Kofaktoren wurde die Expression des Se-spezifischen Elongationsfaktor (EF_{SEC}), dem SECIS bindenden Protein 2 (SBP2) und dem ribosomalen Protein L30 mittels RT-PCR in den 35 d und 60 d alten C57Bl/6 Mäusen unter adäquater Se-Versorgung (Charakterisierung A und D unter 2.2) bestimmt. Weiterhin dienten RT-PCR, ergänzt durch Northern Blot Analysen zur Ermittlung der Expressionsmuster der Selenocystein β -Lyase (β -Lyase), der Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) und der Methyltransferase 1 (TmT 1) in diesen Tieren.

3.7.1 Expression von EF_{SEC} , SBP2, L30 und der β -Lyase in Leber und Niere

Der Vergleich der relativen mRNA Konzentrationen mittels RT-PCR der oben genannten Translations-Kofaktoren, normalisiert auf GAPDH, ließ keine eindeutigen ursächlichen Schlussfolgerungen für die beobachteten Geschlechtsdimorphismen in Leber und Niere zu. Gleiche CT-Werte und Expressionsraten deuten auf analoge Expressionen von SBP2, EF_{SEC} und der β -Lyase in Männchen und Weibchen der 35 d alten Mäusen (Abb. 3.28A, B). Einzig für L30 wurde eine signifikant niedrigere Transkriptmenge in der weiblichen Leber festgestellt (Abb. 3.28A).

Betrachtete man die 60 d alten ovariectomierten Weibchen mit oder ohne E2 Gabe und die kastrierten im Vergleich zu den schein-operierten Männchen, verursachte eine Kastration einen Anstieg der hepatischen SBP2 mRNA Konzentration (Abb. 3.28C). Die Expressionen der restlichen Translations-Kofaktoren waren durch Geschlechtshormone unbeeinflusst.

A

mRNA Leber	CT m	CT w	Expressions- rate	p
SBP2	29,2	29,5	0,933	0,84
EF_{SEC}	24,2	24,1	0,871	0,47
L30	15,5	15,8	0,747	0,04
β-Lyase	22,2	22,4	0,807	0,13
GAPDH	18,7	18,6	-	-

B

mRNA Niere	CT m	CT w	Expressions- rate	p
SBP2	26,0	26,6	0,940	0,92
EF_{SEC}	21,3	22,1	0,747	0,52
L30	16,6	16,5	1,451	0,31
β-Lyase	19,7	20,4	0,834	0,75
GAPDH	14,3	14,8	-	-

C

mRNA Leber	CT ovx+E2	CT ovx	Expressions- rate	p
SBP2	24,8	24,9	1,063	0,72
EF_{SEC}	21,1	21,1	1,100	0,45
L30	17,4	17,2	1,231	0,36
GAPDH	18,8	18,9	-	-

mRNA Leber	CT sham	CT kas	Expressions- rate	p
SBP2	25,2	24,8	1,932	0,001
EF_{SEC}	21,3	21,3	1,427	0,61
L30	17,0	16,9	1,490	0,39
GAPDH	18,5	19,0	-	-

Abb. 3.28 RT Ergebnisse einiger Translations-Kofaktoren der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse (A, B) und 60 d alten C57Bl/6 Mäuse (C) mit suffizienter Se-Fütterung. Die relativen mRNA Konzentrationen von SBP2, EF_{SEC} und der β -Lyase in Lebern und Nieren beider Geschlechter waren gleich. Einzig das ribosomale Protein L30 wies in der weiblichen Leber eine niedrigere mRNA Konzentration im Vergleich zu den Männchen auf. Eine Kastration induzierte einen Anstieg der SBP2 mRNA Konzentration in den Lebern der 60 d alten Männchen (C). Die Expressionen von L30, β -Lyase, EF_{SEC} blieben durch eine Ovariectomie oder eine Kastration unbeeinflusst.

3.7.2 Expression der TmT 1 in Leber und Niere

Die TmT 1 ist ein potentieller Kandidat für die Methylierung der SeCys-abhängigen tRNA. Überraschenderweise konnte man für die Methyltransferase 1 (TmT 1) eine signifikante geschlechtsspezifische Expression, mit einem inversen Expressionsmuster in Leber und Niere beobachten. Die Weibchen zeigten eine 1,7-fach höhere TmT 1 Transkriptmenge in der Leber, die Männchen indes in der Niere (2,4-fach; Abb. 3.29A). Diese Beobachtung lässt sich mit der unter 3.1.2.2 erwähnten gegenläufigen Dio1 und SePP Expression vergleichen (Abb. 3.29B). Somit zeigen die TmT 1 mRNA Konzentrationen die gleichen geschlechtsspezifischen Unterschiede wie die SePP Transkriptmengen und sind gegenläufig zu den Dio1 Aktivitäten in Leber und Niere. Die Untersuchung der hepatischen und renalen SPS2 Expression ergab keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Abb. 3.29C).

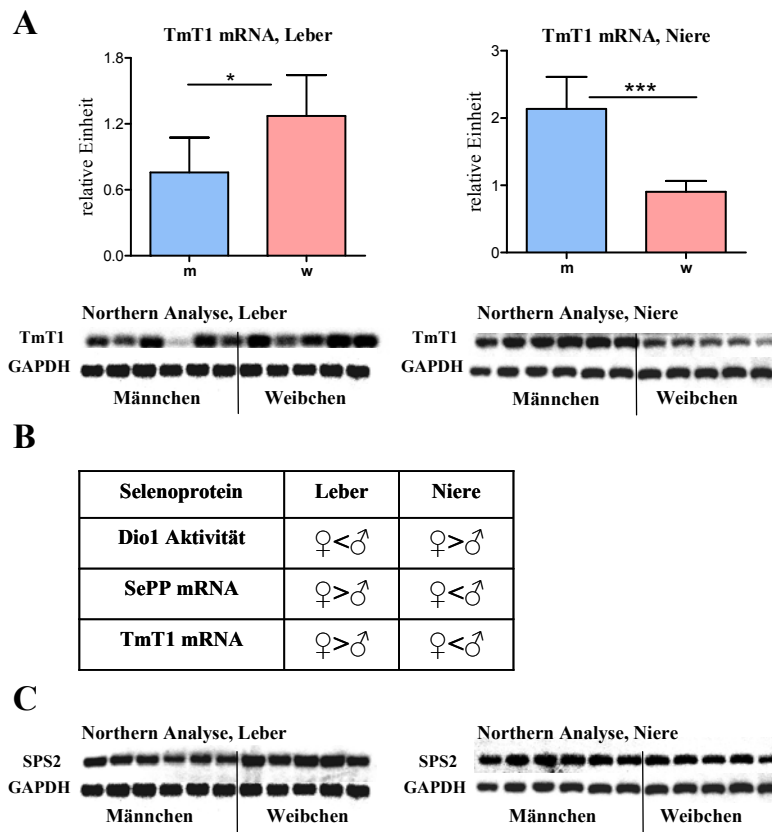


Abb. 3.29 Methyltransferase 1 (TmT 1) und Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) mRNA Konzentrationen der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung. Die hepatischen und renalen TmT 1 mRNA Konzentrationen beider Geschlechter zeigten gegenläufige Werte. In der Leber wiesen die Weibchen eine 1,7-fach höhere TmT 1 mRNA Konzentration auf, in der Niere die Männchen (2,4-fach; A). Diese gegenläufige TmT 1 Expression stimmte mit der geschlechtsspezifischen SePP Expression überein und war entgegengesetzt zu den Dio1 Aktivitäten in Leber und Niere (B). SPS2 Northern Blot Analysen ergaben keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen (C).

3.8 Selenoprotein-Expression in Zellkultur

Eine weitere einfache Möglichkeit den direkten Einfluss von Östrogenen und Androgen auf die Selenoproteinsynthese zu studieren, ist die Stimulation von Zellen mit den entsprechenden Geschlechtshormonen. Dazu wurden unterschiedliche Zelllinien mit 17-β-Estradiol (E2) oder Dihydrotestosterone (T) stimuliert. Da Leber und Niere die hauptsächlich untersuchten Organe waren, wurden die Analysen einerseits an einer humanen Leber-Karzinom-Zelllinie (HepG2), andererseits an Nierenzellen der afrikanischen

Meerkatze (COS-7) durchgeführt. Des weiteren wurde aufgrund der geschlechtsspezifischen GPx3 Expression neben den COS-7 Zellen eine weitere GPx3 exprimierende Zelllinie, die humane follikuläre Schilddrüsenzelllinie (FTC 133), hinzugezogen.

3.8.1 Selenoprotein-Expression in HepG2 Zellen

Sowohl Estradiol (E2) als auch Dihydrotestosteron (T) zeigten nach einer 48-stündigen Inkubation in Se-haltigen Medien (100 nM) keinen stimulierenden Effekt auf die GPx Aktivität in HepG2 Zellen bei einer maximalen jeweiligen Steroidkonzentration von 100 nM (Abb. 3.30A). Indes konnte für die SePP Expression ein signifikanter 1,6-facher Anstieg der Transkriptmenge induziert durch die geringste E2 Konzentration (1nM) in Se-suffizienten Medien nach 48 Stunden Inkubation beobachtet werden (Abb. 3.30B). Die Bestimmungen von SePP mittels ELISA und Western Blot zeigten allerdings keine durch Geschlechtshormone veränderten SePP Proteinmengen (Abb. 3.30C).

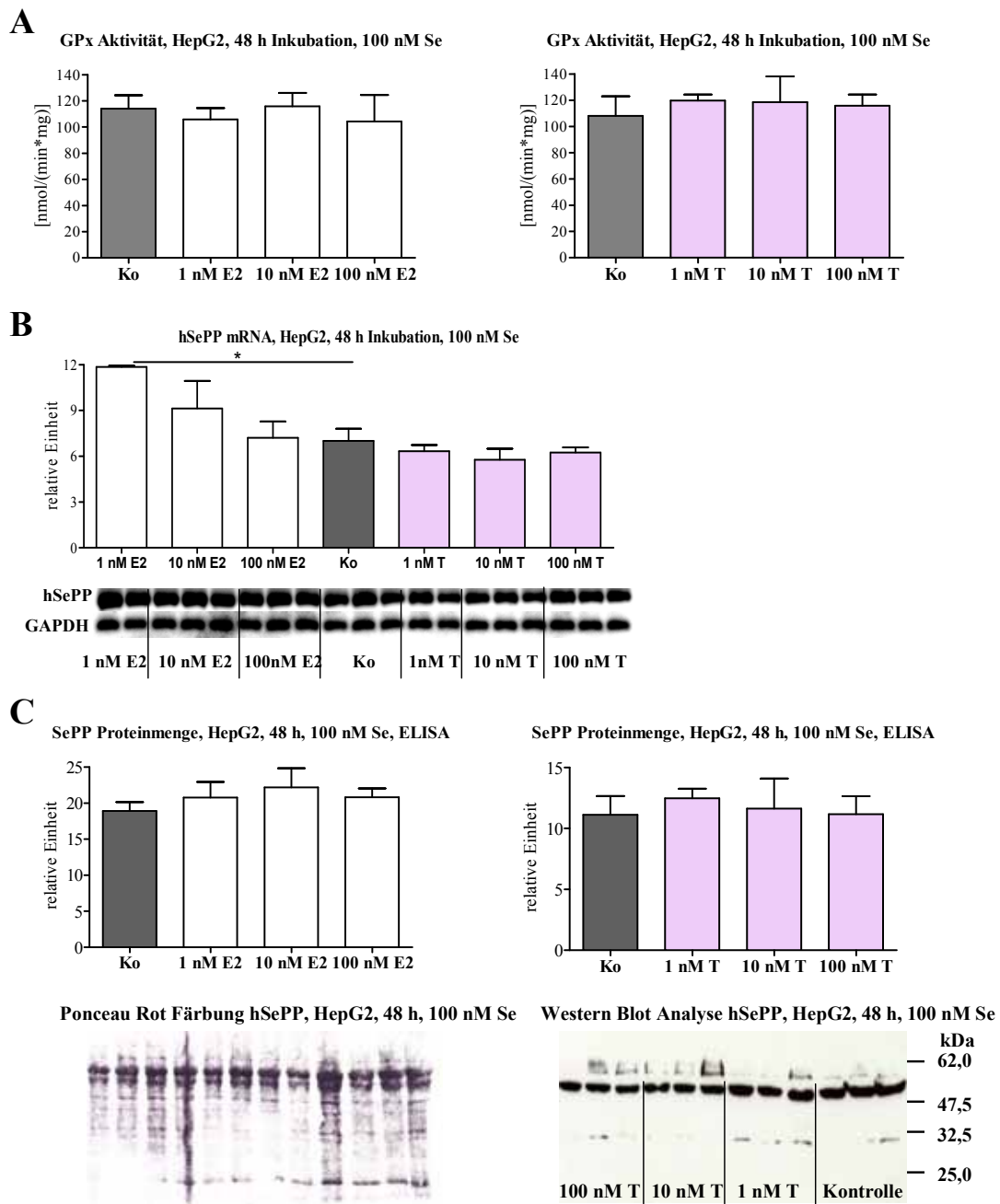


Abb. 3.30 GPx Aktivitäten, SePP mRNA Konzentrationen und SePP Proteinmengen in HepG2 Zellen. Es zeigte sich kein Einfluss einer 48-stündigen 17- β -Estradiol (E2) oder Dihydrotestosteron (T) Stimulation auf die GPx Aktivität in HepG2 Zellen in Se-suffizienten Medien (A). Ebenfalls waren die SePP Proteinmengen, ermittelt mit ELISA und Western Blot, unverändert (C). Die SePP mRNA Konzentrationen zeigten einzig durch die Stimulation mit 1nM E2 signifikant eine ca. 1,6-fache Erhöhung (B).

3.8.2 Selenoprotein-Expression in COS-7 und FTC 133 Zellen

Entgegen der Geschlechtsunterschiede in der Maus konnte man im COS-7 Zellsystem keinen Einfluss von Geschlechtshormonen auf die GPx Aktivität messen (Abb. 3.31A). Ebenfalls war keine Stimulation der GPx3 Aktivität durch E2 oder T in den überwiegend GPx3 exprimierenden FTC 133 Zellen zu beobachten (Abb. 3.31B).

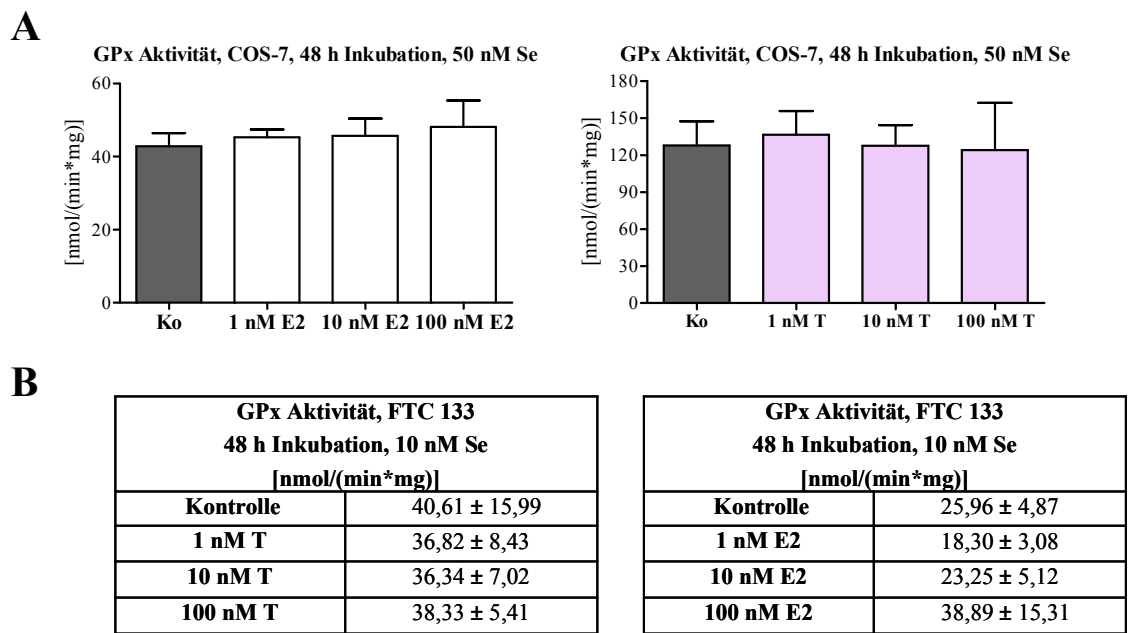


Abb. 3.31 GPx Aktivitäten von COS-7 und FTC 133 Zellen nach Stimulation mit Dihydrotestosteron (T) und 17-β-Estradiol (E2). Die GPx Aktivitäten beider Zelllinien zeigten keine Geschlechtshormoneinflüsse nach 48stündiger Inkubation in Se-suffizienten Medien.

4 Diskussion

Seit seiner Identifikation als essentielles Spurenelement vor ungefähr 50 Jahren, wurde Se zuerst durch ernährungswissenschaftliche Experimente mit einer Vielzahl von physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Eine Reihe klinischer Studien legen nahe, dass eine adäquate Se-Versorgung die Inzidenz verschiedener Krankheiten verringert und den Verlauf von Krankheiten positiv beeinflusst [Rayman 2000(7)]. Die zunehmenden molekularen Erkenntnisse über Se, den Se-Metabolismus sowie die physiologischen Funktionen von Selenoproteinen, ermöglichen mehr und mehr mechanistische Einsichten in die Wirkungsweise von Se [Burk 2002(190); Rayman 2000(7)]. Diverse Studien konnten zeigen, dass der Se-Status entscheidend für die Funktionsfähigkeit einiger Selenoproteine ist und in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen individuell stark variieren kann [Bermano et al. 1995(124); Thomson 2004(12)]. Die vorliegende Arbeit demonstriert zusätzlich an 35 Tage alten C57Bl/6 Mäusen, dass die Expression einiger Selenoproteine in männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich stark ist. Die Ausprägung der geschlechtsspezifischen Selenoprotein-Expression hängt ferner vom Alter der Versuchstiere ab. Dies ging aus dem Vergleich der 35 Tage alten Mäuse mit 60 Tage bzw. 1 Jahr alten Tieren hervor (siehe 4.4). Desweiteren erwies sich durch die Analyse von 35 Tage alten Se-mangelversorgten Tieren eine Abhängigkeit der geschlechtsspezifischen Selenoproteinbiosynthese vom Se-Status der Maus (siehe 4.3). Die Ergebnisse von BALB/c Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6 Tieren zeigten, dass ebenfalls der Mausstamm entscheidend für die Ausprägung von Geschlechtsdimorphismen ist (siehe 4.5).

Interessanterweise wurde zusätzlich beobachtet, dass die geschlechts- und gewebeabhängige Funktionalität von Selenoproteinen nicht nur über sexuell dimorphe mRNA Mengen, sondern auch durch Modifikation der Translation reguliert werden kann (siehe 4.1). Diese geschlechtsspezifische Regulation der Translationseffizienz war absolut unerwartet und eröffnet weitreichende Perspektiven für nachfolgende Analysen. Gerade in klinischen Therapie- und Supplementationsstudien sollte deshalb der Geschlechtsaspekt beim Design, der Durchführung und der Auswertung berücksichtigt werden, um zu aussagekräftigen Schlussfolgerungen gelangen zu können.

4.1 Diskrepanz zwischen mRNA Konzentration und Proteinmenge bei der hepatischen Dio1 und SePP Expression

Anhand der beiden hepatischen Selenoproteine Dio1 und SePP wird deutlich, dass auch in der Selenoproteinbiosynthese nicht in jedem Fall die mRNA Konzentration mit der Proteinmenge korreliert. Dies konnte bis dato im Eisen Metabolismus, in der Ferritin und Transferrin Biosynthese beobachtet werden [Thomson et al. 1999(2)]. Die Dio1 und die SePP Expression in der Leber deuten auf posttranskriptionelle Veränderungen, welche die geschlechtsspezifische Expression dieser beiden Proteine bedingen.

Die hepatische Dio1 mRNA Konzentration war in den weiblichen C57Bl/6 Mäusen höher als in den Männchen. Indes konnte man in den Männchen signifikant höhere Dio1 Aktivitäten messen. Diese extreme Diskrepanz zwischen Dio1 Transkriptmenge und Aktivität wurde nur in den 35 Tage alten Mäusen festgestellt. Die 60 Tage alten Tiere zeigten zwar noch höhere Dio1 Aktivitäten in der männlichen Leber, die mRNA Konzentrationen waren aber in beiden Geschlechtern gleich. In den 1 Jahr alten Tieren wurden analoge Dio1 Aktivitäten als auch Dio1 Transkriptmengen in männlichen und weiblichen Tieren beobachtet. Unter Se-Mangel zeigten die Weibchen zwar noch höhere hepatische Dio1 Transkriptmengen, die Aktivitäten waren aber nicht mehr unterschiedlich reguliert in beiden Geschlechtern. Folglich ist die Ausprägung dieser Unstimmigkeit zwischen mRNA Konzentration und Proteinmenge der hepatischen Dio1 abhängig vom Alter der Tiere und dem Se-Versorgungszustand. Die Weibchen scheinen aber generell die hepatische Dio1 weniger effizient als die Männchen zu translatieren, denn aus höheren mRNA Konzentrationen resultieren niedrigere oder gleiche Aktivitäten im Vergleich zu den Männchen.

Die posttranskriptionellen Veränderungen, welche dieses Missverhältnis geschlechtsspezifisch bewirken, können hier nur vermutet werden. Auf translationaler Ebene lässt die Komplexität der Selenoprotein-Translationsmaschinerie eine Reihe möglicher Modifikationen zu. Denkbar wäre ein direkter oder indirekter Einfluss von Geschlechtshormonen einerseits auf die Expression und damit auf die Verfügbarkeit der Translations-Kofaktoren SBP2, EF_{SEC}, L30 und der Selenocystein-tRNA, andererseits auf das Verhältnis der Selenocystein-tRNA Isoformen zueinander. Posttranslational werden eventuell die Dio1 Proteinstabilitäten oder die Dio1 Aktivitäten durch weibliche oder männliche Geschlechtshormone verändert (siehe 4.2).

Weniger ausgeprägt konnte man diese Diskrepanz zwischen Dio1 mRNA und Proteinmenge auch für die SePP Expression in der Leber beobachten. Die Serum Se-Spiegel der C57Bl/6 Mäuse in den 3 Altersgruppen waren gleich in Weibchen und Männchen, die hepatischen mRNA Konzentrationen dagegen in den weiblichen Tieren signifikant höher, mit Ausnahme der 60 Tage alten Tiere. Da das Selenoprotein P die Hauptfraktion des Plasmaselengehaltes einnimmt [Burk et al. 2005(88)], lässt diese Beobachtung eine effizientere SePP Synthese in der männlichen Leber vermuten (siehe 4.2). Zur genaueren Klärung dieses Aspektes wäre eine Bestimmung der SePP Proteinmenge im murinem Serum zwingend notwendig gewesen, die aber zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund mangelnder spezifischer Antikörper noch nicht direkt möglich ist. Die Beispiele der Dio1 und SePP Expression in der Maus verdeutlichen, dass insbesondere in der Leber die geschlechtsspezifische Selenoproteinbiosynthese posttranskriptional reguliert wird und man in der Selenoproteinsynthese nicht unmittelbar von der mRNA Konzentration auf die Proteinmenge schließen kann.

4.2 Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression in C57Bl/6 Mäusen bei suffizienter Se-Versorgung

Gegenläufige geschlechtsspezifische SePP Expression in Leber und Niere

Generell zeigten die Serum Se-Spiegel in den 35, 60 Tage und 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen unter suffizienter Se-Versorgung keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen und waren in der gleichen Größenordnung angesiedelt. Dies stimmt mit Beobachtungen in der Ratte überein [Finley et al. 1991(75); Yeh et al. 1998(191)]. Daten aus humanen Studien zeigten einerseits höhere Serum Se-Spiegel in Männern [Arnaud et al. 2006(192); Kafai et al. 2003(193); Lopes et al. 2004(194)], andererseits keine Geschlechtsunterschiede [Batarlova et al. 2005(154); Kornitzer et al. 2004(156)]. Die Ursachen für die beobachteten Unterschiede im Serum Se-Spiegel des Menschen lassen sich möglicherweise auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und geographische Lokalisationen zurückführen. So konnte gezeigt werden, dass die Se-Spiegel mit dem Alkohol- und Fleischkonsum ansteigen bzw. mit dem Zigarettenkonsum abnehmen [Kafai et al. 2003(193); Lopes et al. 2004(194)] und diese Parameter zwischen Frauen und Männern variieren [Cunradi et al. 2005(195); Dengler et al. 1994(196); von Bothmer et al. 2005(197)]. Desweiteren wird die Se-Aufnahme durch regional unterschiedliche Se-

Gehalte im Boden bzw. im Futter von Nutztieren beeinflusst [Hartfiel et al. 1988(198); Neve 2000(8)]. Ebenfalls zeigte sich, dass die aufgenommene Se-Form einen Einfluss auf die Se-Resorption hat und diese durch individuelle Ernährungsgewohnheiten variieren kann [Nakamuro et al. 1997(199); Schrauzer et al. 2001(200)].

Das Selenoprotein P (SePP) stellt die Hauptfraktion des im Serum enthaltenen Selens dar und die Leber ist überwiegend für dessen Synthese verantwortlich [Burk et al. 2005(88); Gao et al. 2004(201) Schweizer et al. 2005(98)]. Umso erstaunlicher ist, dass man in den 35 Tage alten C57Bl/6 Mäusen bei gleichen Serum Se-Spiegeln in beiden Geschlechtern eine höhere SePP mRNA Konzentration in der weiblichen Leber feststellen konnte. Die geschlechtsspezifische SePP Expression in der Leber ließ sich nicht auf unterschiedliche Se-Organkonzentrationen zurückführen. Diese waren in männlichen und weiblichen Lebern gleich.

Die Weibchen scheinen das hepatische SePP Gen stärker zu transkribieren, möglicherweise durch einen positiven Einfluss von Östrogenen auf beteiligte Transkriptionsfaktoren oder höhere mRNA Stabilitäten als bei den Männchen. Andererseits wird SePP aber weniger effizient in der weiblichen Leber translatiert, da aus höheren weiblichen SePP Transkriptmengen gleiche Serum Se-Spiegel und TCA-fällbare Selenoproteinfraktionen beider Geschlechter resultierten. Für diese Vermutung spricht die Beobachtung, dass diese weiblichen Mäuse zusätzlich höhere Serum GPx3 Aktivitäten aufwiesen. Damit könnte die SePP Konzentration im Serum der Weibchen sogar durchaus geringer im Vergleich zu den Männchen sein. E2 scheint neben dem positiven transkriptionellen einen negativen posttranskriptionellen Effekt auf die SePP Expression zu besitzen. Denkbar wäre aber auch ein umgekehrter Zusammenhang in den Männchen, nämlich eine Inhibition der Transkription, aber eine effektivere Translation als bei den Weibchen.

Eine Kastration oder eine Ovariectomie von C57Bl/6 Mäusen zeigte keinen Einfluss auf die hepatische SePP mRNA Konzentration. Offenbar beeinflussen Geschlechtshormone nicht direkt die hepatische SePP Transkription. Ebenso waren die Serum Se-Spiegel nicht signifikant, sondern nur tendentiell unterschiedlich zwischen ovariectomierten (ovx) und ovx Mäusen mit E2 Gabe sowie kastrierten Tieren im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen. Aus diesen Daten läßt sich nicht genau schließen, ob Östrogene oder Androgene einen modulierenden Einfluss auf die hepatische SePP Expression besitzen,

zumindest liegt keine massive Abhängigkeit der SePP Expression von den Sexualsteroiden vor.

Um eventuell einen direkten Einfluss dieser Geschlechtshormone auf die SePP Biosynthese festzustellen, wurden humane Leber-Karzinom-Zellen (HepG2) Zellen mit 17- β -Estradiol (E2) oder Dihydrotestosteron (T) über 48 h in Se-suffizienten Medien stimuliert. Die anschließende Bestimmung der SePP Proteinmenge mittels ELISA und Western Blot zeigte keinen deutlichen Einfluss von E2 oder T. Die mRNA Konzentration der HepG2 Zellen wurde ebenfalls nicht durch T oder hohe Konzentrationen an E2 beeinflusst. Einzig die Stimulation mit einer niedrigeren E2 Konzentration (1 nM) erhöhte die SePP mRNA Konzentration signifikant. Wenn sich diese Beobachtung in detaillierten Folgestudien verifizieren lässt, so bestätigt es unsere Vermutung eines geringen positiven transkriptionellen E2 Effektes kombiniert mit einem negativen posttranskriptionellen E2 Einfluss. Andererseits konnte in Frauen eine positive Korrelation der Serum Se-Spiegel mit den Serum Östrogenkonzentrationen beobachtet werden und prämenopausale Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme zeigten generell höhere Se-Konzentrationen im Serum [Arnaud et al. 2006(192); Ha et al. 2003(165); Kafai et al. 2003(193)]. Inwiefern dies auf eine höhere hepatische SePP Expression im weiblichen Geschlecht zurückzuführen ist, ist fraglich. Zumal diese Korrelation auch in Bezug auf die GPx3 Aktivität im Serum gezeigt werden konnte [Ha et al. 2003(165); Rush et al. 2003(161)] und dieses Enzym im Menschen ca. 22% des gesamten Serum Se-Gehaltes einnimmt [Gao et al. 2004(201)]. Nichtsdestotrotz bleiben zwei gegenläufige Effekte von E2 auf die hepatische SePP Expression festzuhalten: ein positiver Effekt auf die Transkription und ein negativer Effekt auf die Translation bzw. posttranslationale Proteinstabilität.

Möglicherweise spielt bei den hier aufgeführten geschlechtsspezifischen Selenoprotein-Expressionen die extragonadale Estradiolbiosynthese via periphere Konversion zwischen Androgenen und Östrogenen eine Rolle. Zumindest in Knochen-, Brust-, und Fettgewebe konnte man neben der glandulären Sekretion einen beachtlichen Beitrag der peripheren E2 Produktion an dem zirkulierenden E2 Hormonpool feststellen [Simpson et al. 2001(202); 2005(203)]. In Niere, Leber, Schilddrüse und Herz scheint dieser Konversionsprozess vernachlässigbar gering zu sein [Williams Textbook of Endocrinology 2002(204)]. In folgenden Überlegungen wird dieser Aspekt nicht weiter beachtet.

Die mRNA Konzentration des ribosomalen Proteins L30 in der weiblichen Leber, welches neben SBP2 das SECIS Element binden kann [Chavatte et al. 2005(114)], war im Vergleich zu den Männchen geringer. L30 könnte somit ein durch E2 herunter-reguliertes Protein sein, dessen geringere Aktivität in den Weibchen eine niedrigere Translationseffizienz von SePP bewirkt, resultierend in geringeren SePP Proteinmengen im Vergleich zu den männlichen Mäusen.

Vorstellbar wäre auch, dass SePP nicht nur als Se-Transport- und Speicherprotein dient, sondern auch antioxidative Funktionen übernimmt [Burk et al. 2005(88); Saito et al. 1999(91); Takebe et al. 2002(92)]. Somit würden unterschiedliche Zustände oxidativen Stresses bzw. ungleiche inflammatorische Zustände, ausgelöst durch z.B. eine ROS Exposition oder andere Umweltfaktoren, nicht nur Änderungen im Glutathion-Peroxidasesystem hervorrufen, sondern auch die hepatische SePP Expression beeinflussen. Ein Marker für die Belastung mit oxidativem Stress und den inflammatorischen Zustand ist die Expression des Metallothioneins 2 (MT II) [Sato et al. 2002(205)]. Die hepatische MT II Transkriptmenge war signifikant höher in den 35 Tage alten weiblichen Mäusen im Vergleich zu den Männchen. Aus der Literatur ist bekannt, dass pro-inflammatorische Faktoren wie der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF alpha), das Interleukin 1beta (IL-1beta) sowie das Interferon gamma (INF gamma) humane SePP Promotorkonstrukte in vitro regulieren können [Burk et al. 2005(88); Mostert et al. 2003(89)]. Allerdings kann dies in der hepatischen geschlechtsspezifischen SePP Expression nur eine untergeordnete Rolle spielen, da die Serum Konzentrationen an TNF alpha, IL-1beta und Interleukin 6 nicht auf unterschiedliche inflammatorische Zustände zwischen Weibchen und Männchen deuten.

In der Niere zeigten die 35 Tage alten Männchen signifikant höhere SePP mRNA Konzentrationen. Diese extremen Unterschiede wurden ebenso in den 60 Tage und 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen beobachtet (siehe 4.4). Eine Kastration induzierte eine Reduktion der männlichen SePP mRNA Konzentration bis in Bereiche der weiblichen Transkriptmenge. Eine Ovariectomie hatte keinen Einfluss. Die renalen Se-Konzentrationen waren zwischen schein-operierten und kastrierten Mäusen als auch ovariectomierten und ovx Tieren mit E2 Gabe gleich. Dies deutet auf einen eindeutigen positiven Effekt männlicher Geschlechtshormone auf die renale SePP Transkription, entgegen der Beobachtung in der Leber. In humanen Prostatazellen beobachtete man einen positiven An-

stieg der SePP mRNA Konzentration durch eine Stimulation mit einem synthetischen Androgen und eine Inhibition mit Genistein [Takahashi et al. 2006(206)]. 17- β -Estradiol zeigte keinen Einfluss auf die SePP Expression. Androgene könnten direkt über den renalen SePP Promoter wirken. Denkbar wäre aber auch eine effizientere renale Se-Aufnahme in den Männchen durch einen Androgeneinfluss auf die Se-Resorption. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der sexuelle Dimorphismus der SePP Expression stark vom Gewebe abhängt und in Niere und Leber gegenläufig ist. Die Ursachen für diese Geschlechtsunterschiede sind unbekannt. Erstmalig in der Selenoproteinsynthese konnte man beobachten, dass die SePP mRNA Konzentrationen in beiden Geschlechtern nicht mit den Serum Se-Spiegeln korrelierten und dies auf posttranskriptionelle Modifikationen durch Geschlechtshormone zurückzuführen ist.

Geschlechtsspezifische GPx3 und geschlechtsunabhängige GPx1 Expression

Die Glutathion-Peroxidasen, am Beispiel der GPx3 und GPx1, präsentierten kein einheitliches geschlechtsspezifisches Expressionsmuster.

Die 35 Tage alten weiblichen Mäuse zeigten signifikant eine höhere Serum GPx3 Aktivität unter Se-suffizienter Fütterung. Die in der Literatur vorhandenen Daten zur GPx3 Expression sind sehr heterogen. In Ratten fand man einerseits keine Geschlechtsunterschiede in der Serum GPx3 Aktivität [Yeh et al. 1998(191)], andererseits aber auch eine höhere Aktivität im Serum von männlichen Sprague-Dawley Ratten, entgegen unserer Beobachtung in Mäusen [Finley et al. 1991(75)]. Im Menschen wurde ebenfalls eine höhere GPx3 Aktivität im Serum von Frauen gemessen [Rush et al. 2003(161)]. Keine humanen Geschlechtsunterschiede beobachteten dagegen Guemouri et al. [Guemouri et al. 1991(162)].

Die Beobachtung einer höheren GPx3 Serumaktivität der Weibchen spiegelte sich nicht auf der Transkriptebene wieder. In Anbetracht der Tatsache, dass die Niere der Hauptsyntheseort der Serum GPx3 ist [Avissar et al. 1994(72)], wurden keine unterschiedlichen renalen GPx3 mRNA Konzentrationen in beiden Geschlechtern festgestellt. Dies deutet auf einen positiven posttranskriptionellen E2 Einfluss auf die GPx3 Expression, möglicherweise durch eine Steigerung der Translationseffizienz oder/und der Proteinstabilitäten in den weiblichen Tieren. Dies lassen auch humane Studien vermuten. In Frauen beobachtete man eine positive Korrelation zwischen GPx3 Aktivität in Serum

und Erythrozyten und der Serum Östrogen Konzentration [Akova et al. 2001(207); Ha et al. 2003(165); Massafra et al. 2000(163)].

Überraschenderweise bewirkte aber eine Kastration der C57Bl/6 Mäuse eine Reduktion der Serum GPx3 Aktivität und im gleichen Maße der renalen GPx3 mRNA Konzentration. Eine Ovariectomie zeigte keine Auswirkungen. Dies deutet indes auf eine positive transkriptionelle Regulation der renalen GPx3 Expression durch Androgene und würde die beobachtete höhere GPx3 Aktivität in den Weibchen nicht erklären. Im murinen männlichen Genitaltrakt konnte ein solch positiver Einfluss von Androgen auf die GPx3 Expression gezeigt werden [Schwaab et al. 1998(167)]. Anscheinend sind sowohl männliche als auch weibliche Geschlechtshormone an der Regulation der GPx3 Expression beteiligt. In der Prostata von Ratten ließ die kombinierte Gabe von E2 und Testosteron die GPx Aktivität in kastrierten Tieren stärker ansteigen als in Tieren mit einer isolierten Testosterongabe [Murakoshi et al. 1999(208)].

Zusätzlich wurde die Möglichkeit des direkten Einflusses von Geschlechtshormonen auf die GPx3 Expression im Zellsystem analysiert. Dazu wurden GPx3 synthetisierende Nierenzellen (COS-7) und Schilddrüsenzellen (FTC 133) mit Dihydrotestosteron oder 17- β -Estradiol in Se-suffizienten Medien über 48 h stimuliert. Unterschiede in den GPx3 Aktivitäten wurden nicht gemessen. Dies verdeutlicht, dass erst das komplexe Zusammenspiel indirekter und direkter Wirkmechanismen der Geschlechtshormone in vivo die geschlechtsspezifische GPx3 Expression bedingen.

Studien zeigten, dass die GPx3 Biosynthese stark durch Ernährungs- und Umweltfaktoren, wie z.B. der Tageszeit, der Se-Zufuhr, Zuständen der Hyperoxie oder des oxidativen Stresses, beeinflusst wird [Finley et al. 1991(75); Kim et al. 1999(76)]. Entsprechende responsive Bereiche im GPx3 Promotor wurden gefunden [Bierl et al. 2004(209)]. Die höheren MT II Transkriptmengen in der weiblichen Leber sprechen für einen erhöhten Zustand oxidativen Stresses in den 35 d alten Weibchen. Eine resultierende Erhöhung der weiblichen GPx3 Aktivität durch Modifikation der Translation wäre denkbar. Bierl et al. beobachtete in HEK 293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen) einen Anstieg der GPx3 Expression mit steigenden Konzentrationen an Seleonecysteinyl-tRNA, SPS1 und tendenziell auch an SBP2 [Bierl et al. 2004(209)]. Die RT-PCR Ergebnisse der 35 d alten Mäuse zeigten keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Transkriptmengen der renalen Translations-Kofaktoren

EF_{SEC}, L30, SBP2 oder der β -Lyase. Ob weitere Faktoren wie die Selenocysteinyl-tRNA einer E2 Regulation unterliegen und damit die GPx3 Proteinsynthese beeinflussen, bedarf weiterführender Untersuchungen. Möglicherweise variiert die SBP2 Verfügbarkeit geschlechtsspezifisch, da der Redoxzustand dieses Translations-Kofaktors entscheidend für dessen intrazelluläre Lokalisation und damit für die Beteiligung an der Selenoproteinbiosynthese ist [Papp et al. 2006(210)]. Ungleiche geschlechtsspezifische SBP2 Redoxzustände, die eine differentielle Lokalisation dieses geschwindigkeitsbestimmenden Translationsfaktors bedingen, könnten also die unterschiedlichen Translationsineffizienzen in Weibchen und Männchen verursachen, wären aber durch eine RT-PCR Analyse nicht detektierbar.

Die Expression der zytosolischen GPx (GPx1) im C57Bl/6 Mausstamm verdeutlicht in dieser Studie, dass nicht alle Selenoproteine geschlechtsspezifisch exprimiert werden. In den 35 Tage alten C57Bl/6 Mäusen unter Se-suffizienter Fütterung war die GPx1 mRNA Konzentration und GPx Aktivität in Leber und Niere in beiden Geschlechtern gleich. Diese Beobachtung wird dadurch bestätigt, dass eine Kastration oder Ovariectomie mit oder ohne anschließender E2 Gabe keine Veränderungen in den renalen und hepatischen GPx mRNA Konzentrationen als auch Aktivitäten bewirkte und auch die 60 Tage alten C57Bl/6 Mäuse unter Se-suffizienter Fütterung keine geschlechtsspezifische GPx Expression in Leber und Niere aufwiesen. Ferner ist die Expression der GPx1 von der gewebespezifischen Se-Bioverfügbarkeit abhängig [Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sunde et al. 1997(62)] und die Se-Konzentrationen in Leber und Niere zeigten im Einklang mit der GPx1 Expression keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Auch die direkte Stimulation von HepG2 Zellen mit E2 und Dihydrotestosteron verursachten in Se-suffizienten Medien keine Veränderungen in den GPx Aktivitäten. Die GPx1 stellt somit ein Selenoprotein dar, dessen Expression unter ausreichender Se-Versorgung in Leber und Niere unbeeinflusst durch Geschlechtshormone ist. Allerdings kann auch die GPx1 Expression gewebespezifisch und speziesspezifisch durch Geschlechtshormone beeinflusst werden. In Erythrozyten stellte man einen Zusammenhang zwischen GPx Aktivität und Östrogenspiegel fest. Post- im Vergleich zu prämenopausalen Frauen wiesen geringere erythrozytäre GPx Aktivitäten auf, die durch eine entsprechende E2 Gabe wiederum signifikant erhöht werden konnten [Massafra et al. 2002(164)].

Die Feststellung gleicher hepatischer GPx Aktivitäten beobachtete man ebenso in 12 und 24 Wochen alten Kunmin Mäusen [Wu et al. 2003(211)]. In 30 Tage alten CBA Mäusen wurde jedoch eine höhere hepatische GPx Aktivität in den Weibchen gemessen [Sobocanec et al. 2006(212); Sverko et al. 2004(213)]. Dies bestätigte sich auch in 30 und 70 Tage alten weiblichen Wistar Ratten und kongruent mit einer höheren hepatischen Se-Konzentration auch in Sprague-Darwley Ratten [Banos et al. 2005(214); Pinto et al. 1969(215); Yamamoto et al. 2002(216)]. In den Nieren zuletzt genannter Tiere zeigten wiederum die Männchen höhere Se-Konzentrationen und resultierende höhere GPx Aktivitäten [Finley et al. 1991(25)]. Eine Ovariectomie induzierte, entgegen unseren Beobachtungen in der Maus, eine Reduktion der hepatischen GPx Aktivität in Wistar Ratten, eine Kastration bewirkte keine Veränderungen. Die anschließende Gabe von E2 oder Progesteron normalisierte die GPx Aktivität in ovariectomierten Ratten und ließ die Werte in kastrierten Tieren bis auf weibliche Niveaus ansteigen [Pinto et al. 1969(215)].

Die aufgeführten Literaturdaten und unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass die GPx1 Expression stark zwischen den Spezies variiert (siehe 4.5), ebenfalls das Alter eine entscheidende Rolle spielt (siehe 4.4) und man die Daten diverser Studien nur unter Berücksichtigung zusätzlicher Randparameter miteinander vergleichen kann.

Die GPx1 Expression wird durch Umwelteinflüsse reguliert und unterschiedliche Bedingungen in den einzelnen Experimenten (z.B. Belastung mit Stressoren, variierte Se-Zufuhr) könnten zumindest teilweise die heterogene Datenlage zur geschlechtsspezifischen GPx3 und GPx1 Biosynthese erklären [Merante et al. 2002(217)]. Offenbar trägt eine erhöhte weibliche Anfälligkeit für oxidativen Stress indirekt zur geschlechtsspezifischen GPx3 Expression bei. Dabei wird die GPx3 Biosynthese im Gegensatz zur geschlechtsunabhängigen hepatischen und renalen GPx1 Expression posttranskriptional reguliert. Dies bedingt, dass erneut die renalen GPx3 mRNA Konzentrationen nicht direkt mit den Serum Aktivitäten korrelieren, analog zur SePP Expression.

Gegenläufige geschlechtsspezifische Expression der Dio1 in Leber und Niere

Der Geschlechtseinfluss auf die gewebespezifische Selenoprotein-Expression war am auffälligsten für die Dio1 zu beobachten. Ebenso zeigte sich bei diesem Selenoprotein

sehr eindrucksvoll, dass nicht immer die mRNA Konzentration mit der Aktivität bzw. der Proteinmenge übereinstimmt.

In den 35 Tage alten Se-suffizienten C57Bl/6 Mäusen wurde überraschenderweise eine gegenläufige Dio1 Aktivität in Niere und Leber gemessen. Die Männchen zeigten in der Leber eine höhere, in der Niere indes eine niedrigere Dio1 Aktivität im Vergleich zu den Weibchen. In Wistar und Sprague-Dawley Ratten wurde ebenfalls eine höhere hepatische Dio1 Aktivität und Dio1 Transkriptmenge in Männchen beobachtet [Harris et al. 1979(168); Lisboa et al. 2001(140), Ogawa et al. 1999(141); Miyashita et al. 1995(169); Santini et al. 1994(218)]. Andererseits fand man, entgegen unseren Beobachtungen, auch eine höhere hepatische Dio1 Aktivität in weiblichen Dutch-Miranda Ratten [da Costa et al. 2001(170)]. Die geschlechtsdimorphe Expression in der murinen Niere wurde in Ratten nicht bestätigt [Harris et al. 1979(168); Ogawa et al. 1999(141); Santini et al. 1994(218)].

Interessanterweise beobachtete man in der Leber eine höhere Dio1 Transkriptmenge aber eine niedrigere Aktivität in den Weibchen und umgekehrt zutreffend für die Männchen. Eine Kastration in den männlichen C57Bl/6 Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Dio1 Aktivität und mRNA Konzentration in der Leber. Hingegen induzierte eine Ovariectomie einen Anstieg der hepatischen Dio1 Aktivität bei tendenziell reduzierten Transkriptmengen. Eine anschließende E2 Injektion der ovariectomierten Mäuse reduzierte die Dio1 Aktivitätswerte bis in männliche Wertebereiche. Offenbar translatieren weibliche Tiere die hepatische Dio1 weniger effizient als die Männchen, denn eine höhere Dio1 mRNA Konzentration in der weiblichen Leber bedingte eine geringere Dio1 Aktivität. Wie zuvor erwähnt, konnte man dies weniger stark ausgeprägt auch für die hepatische SePP Synthese beobachten. Weibliche Geschlechtshormone vermindern anscheinend die hepatische Dio1 Proteinbiosynthese durch eine Reduktion der Translationseffizienz oder der Proteinstabilität (Abb. 4.1). Wobei eine durch Ubiquitinierung regulierte Proteindegradation nur für die Dio2 bekannt ist, nicht aber für die Dio1 beobachtet wurde [Bianco et al. 2005(219)].

Grundsätzlich scheint E2 in den 35 Tage alten Mäusen einen positiven Effekt auf die hepatische Dio1 Transkription zu besitzen, welcher die erhöhte Dio1 mRNA Konzentration in den Weibchen verursacht (Abb. 4.1). In Ratten konnte sowohl ein Einfluss von Androgenen als auch von Östrogenen auf die hepatische Dio1 Expression gezeigt wer-

den. Eine Ovariectomie reduzierte einerseits in Wistar Ratten die Dio1 Aktivität [Lisboa et al. 2001(140)], konträr zu unseren Ergebnissen in Mäusen. Eine anschließende E2 Verabreichung induzierte in diesen ovariectomierten Tieren einen Anstieg der Dio1 Aktivität [Lisboa et al. 2001(140)]. Andererseits beobachtete man keine Veränderungen in ovariectomierten Wistar Ratten auf Aktivitäts- und mRNA Ebene [Miyashita et al. 1995(169)]. Ebenso bewirkte eine Kastration eine Reduktion der Dio1 Aktivität und Transkriptmenge in Wistar Ratten und die erniedrigten Werte ließen sich durch eine Progesterongabe wieder normalisieren [Lisboa et al. 2001(140); Miyashita et al. 1995(169); Ogawa et al. 1999(141)].

In unseren 35 Tage alten Mäusen scheinen nur weibliche Geschlechtshormone aktivierend auf transkriptioneller und inhibierend auf posttranskriptioneller Ebene zu wirken. Dabei könnte der positive transkriptionelle E2 Effekt direkt mittels eines responsiven Elements im Dio1 Promotor oder indirekt über E2 regulierte Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Zellkulturversuche mit kultivierten humanen Leber-Karzinom-Zellen und Dio1 Promotorkonstrukten, die keinen Einfluss von gonadalen Steroiden auf die Dio1 Aktivität zeigen konnten, lassen eher letzteres vermuten [Herbert 2006(220)]. Denkbar wäre ebenso eine durch E2 vermittelte vermehrte Synthese von Substanzen, wie z.B. TSH, T3 oder Retinoiden, welche durch responsive Elemente im Dio1 Promoter die höheren Dio1 mRNA Mengen in der weiblichen Leber bewirken. So weist die weibliche murine Leber z.B. höhere totale Retinolmengen auf [O'Byrne et al. 2005(221)] und setzt T4 effizienter zu T3 um [da Costa et al. 2001(170)]. Niedrigere TSH Konzentrationen im Serum wurden ebenfalls in weiblichen C57Bl/6 Mäusen im Vergleich zu den Männchen gemessen, allerdings bei gleichen T3 und T4 Spiegeln in beiden Geschlechtern [Schomburg et al. 2006(100)].

Der inhibitorische E2 Einfluss auf die hepatische Dio1 Translation wird möglicherweise durch eine E2 vermittelte reduzierte Expression von Translations-Kofaktoren bedingt. Die Beobachtung einer verringerten mRNA Konzentration des ribosomalen Proteins L30 in der weiblichen 35 Tage alten Leber könnte möglicherweise zu einer Reduktion der Translationseffizienz infolgedessen zu geringeren Dio1 Aktivitäten in den Weibchen führen, analog zur SePP Expression. Weiterhin ist auffällig, dass die weibliche Leber eine höhere Methyltransferase 1 (TmT 1) mRNA Konzentration zeigte, entgegengesetzt zur Dio1 Aktivität. Dieses Enzym ist ein Kandidat für die Methylierung der

Selenocysteinyl-tRNA. Das resultierende Verhältnis der beiden Selenocysteinyl-tRNA Isoformen zu einander bestimmt die Expression einzelner Selenoproteine [Carlson et al. 2005(137); Hatfield et al. 2002(10); Schomburg et al. 2004(41)]. Eventuell bedingt diese vermehrt stattfindende Methylierung in der weiblichen murinen Leber eine geringere Dio1 Proteinsynthese bzw. Aktivität.

Die renale Dio1 Expression zeigte signifikant höhere Dio1 Aktivitäten und mRNA Konzentrationen in den Weibchen. Veränderungen durch eine Kastration traten nicht ein. Indes reduzierte eine Ovariectomie die renale Dio1 Transkriptmenge und eine anschließende E2 Injektion hob diesen Effekt wieder auf. Diese Beobachtungen deuten auf einen positiven E2 Einfluss auf die renale Dio1 Transkription. Die Mechanismen der direkten oder indirekten Regulation der Transkription via E2 könnten die gleichen sein, wie schon am Beispiel der Leber erörtert. Eine geschlechtsspezifische Dio1 Expression in der Niere konnte bis dato nur durch uns in der Maus gezeigt werden, in Ratten wurden keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern publiziert [Harris et al. 1979(168); Ogawa et al. 1999(141)].

Auffällig war erneut die gegenläufige Expression von TmT 1 und Dio1 in der Niere. Interessanterweise wies die TmT 1 die gleiche geschlechtsspezifische Expression wie SePP auf, war folglich invers zu den Dio1 Aktivitäten in Leber und Niere reguliert (siehe 3.29B). Möglicherweise konkurrieren Dio1 und SePP um einen limitierenden Pool von bestimmten Selenocysteinyl-tRNA Substraten für eine effiziente Selenoprotein-Biosynthese in Leber und Niere. Diese Konkurrenz wird eventuell in männlichen und weiblichen Mäusen durch eine unterschiedliche gewebespezifische TmT 1 Biosynthese reguliert. Zur genaueren Klärung dieses Sachverhaltes bedarf es jedoch einer direkten Bestimmung der TmT 1 und SePP Proteinmengen, was zu diesem Zeitpunkt leider noch nicht möglich war.

In Anbetracht des komplexen Aufbaus der Niere mit den verschiedenen Schichten des Nierenparenchyms (Nierenrinde, -mark) und den unterschiedlichen renalen Zellarten (Glomerulus-, Tubuluszellen) wäre auch eine unterschiedliche geschlechtsspezifische Lokalisation der SePP und Dio1 Biosynthese innerhalb der Niere denkbar. SePP wurde bevorzugt in den Glomeruluszellen nachgewiesen und die renale Dio1 vorwiegend in den Tubuluszellen lokalisiert [Burk et al. 1994(222), Lee et al. 1993(223)]. Dementsprechend könnte die SePP und Dio1 Biosynthese verschiedener renaler Kompartimente

unterschiedlich stark durch Geschlechtshormone beeinflusst werden und so in der Summe die jeweils beobachteten Geschlechtsunterschiede bewirken.

Exemplarisch ermittelte Dio1 Aktivitäten in den Herzen und Schilddrüsen der 35 Tage alten Se-suffizienten C57Bl/6 Mäuse deuten ebenfalls auf eine geschlechtsspezifische Dio1 Expression analog zur Leber. Die höhere Dio1 Aktivität in den männlichen Mäusen, konnte durch da Costa et al. in Ratten nicht bestätigt werden. Allerdings beobachtete man in dieser Spezies einen Anstieg der Dio1 Aktivität mit dem Alter in den Weibchen [da Costa et al. 2001(170)].

In dieser Arbeit wurde die Maushypophyse nicht in die Analysen mit einbezogen, Studien in Ratten zeigten aber eine höhere Dio1 Expression in der Adenohypophyse von Weibchen [Köhrle et al. 1995(224)], ein weiteres Beispiel zur Verdeutlichung des gewebespezifischen Geschlechtseinflusses auf die Dio1 Expression.

Inwiefern die gewebespezifischen Geschlechtsunterschiede in den Dio1 Aktivitäten bedeutsam für die lokale T3 Bereitstellung und/oder die T3 Serumkonzentration (Leber, Schilddrüse) sind und damit den Schilddrüsenhormonstoffwechsel systemisch oder lokal geschlechtsspezifisch beeinflussen, bedarf zukünftiger Analysen. Besonders das Herz stellt ein Hauptzielorgan der Schilddrüsenhormone dar und bei Patienten mit einer ischämischen Herzerkrankung wurden reduzierte Dio1 Aktivitäten im Myokard festgestellt. Der Geschlechtsaspekt fand bedauerlicherweise, in Anbetracht der geschlechtsdimorphen Dio1 Expression in diesem Organ, keine Beachtung [Sabatino et al. 2000(225)]. Die für die lokale T3 Bereitstellung ebenfalls erforderlichen Dio2 Aktivitäten in der Schilddrüse und im Herzen zeigten jedoch keine Geschlechtsunterschiede.

Zusammenfassend zeigte die Dio1 Expression einen deutlichen gewebespezifischen Geschlechtsdimorphismus, wobei ein entgegengesetztes Expressionsmuster in Niere und Leber zu beobachten war. Dabei scheinen die Geschlechtsunterschiede in der hepatischen Dio1 Biosynthese sowohl durch positive transkriptionelle als auch negative posttranskriptionelle Mechanismen via E2 reguliert zu werden. Diese bewirken, dass in ausgeprägter Art und Weise die hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen nicht mit den Aktivitäten in beiden Geschlechtern übereinstimmen. Indes lässt sich bei der renalen Dio1 Expression ein positiver transkriptioneller E2 Einfluss vermuten (Abb. 4.1). Unter der Annahme, dass die SePP Translation weniger effizient in den Weibchen abläuft (siehe 4.2), wies die weibliche 35 Tage alte Leber geringere Dio1 Aktivitäten und SePP

Proteinmengen auf. Die männliche Leber scheint die Selenoproteine Dio1 und SePP effizienter zu translatieren. Dagegen deutet die höhere renale Dio1 und GPx3 Expression auf eine effizientere Selenoproteinbiosynthese in der weiblichen Niere.

4.3 Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression in Abhängigkeit von der Se-Zufuhr

Se-Bioverfügbarkeit reguliert die geschlechtsspezifische GPx und SePP Expression

Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass die Expression von SePP, GPx3 und GPx1 in Leber und Niere stark von der Se-Bioverfügbarkeit abhängt [Behne et al. 1988(122); Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sun et al. 2002(109)]. Dabei wird die Effizienz der Se-Aufnahme und damit die Se-Bioverfügbarkeit offenbar zusätzlich durch die aufgenommene Se-Form (siehe 1.3) beeinflusst [Nakamuro et al. 1997(199); Schrauzer 2001(200)]. In den verschiedenen Mausexperimenten dieser Arbeit wurde Se generell via Selenit zugeführt und stellte folglich einen konstanten Faktor dar. Die zugeführte Se-Form als weitere Einflussgröße auf die Se-Bioverfügbarkeit wurde im nachfolgenden nicht weiter betrachtet. Bei Vergleichen verschiedener Studien zur Selenoprotein-Expression sollte der Aspekt der zugeführten Se-Form in Hinsicht auf die Se-Bioverfügbarkeit unbedingt berücksichtigt werden.

Die geringere Se-Zufuhr der 35 Tage alten C57Bl/6 Mäuse (0,07 ppm, Charakterisierung 2.2/Tab. 2D) im Vergleich zu den Se-suffizient versorgten Tieren (0,24 ppm) bedingte eine Reduktion der hepatischen SePP Produktion und dies spiegelte sich in den ca. zehnfach reduzierten Serum Se-Spiegeln wider. Dabei beobachtete man erneut keine Geschlechtsunterschiede in den Serum Se-Konzentrationen. Die Se-Mangel Leber produzierte gleichermaßen viel SePP Transkript in beiden Geschlechtern. Unter Se-Defizienz wird nicht unmittelbar die Transkriptionsrate von SePP sondern die mRNA Konzentration reduziert [Burk et al. 1994(222)]. Offenbar reduziert sich bei verminderter Se-Zufuhr die höhere mRNA Stabilität oder der positive transkriptionelle E2 Einfluss in den Weibchen. Infolgedessen war die signifikant höhere hepatische SePP mRNA Konzentration in der weiblichen Leber unter Se-Suffizienz nicht mehr in den Se-armen Lebern feststellbar. Dies bestärkt unsere Vermutung, dass die männliche Leber SePP effizienter als die weibliche produziert und dies weniger stark durch die Se-Bioverfügbarkeit beeinflusst wird.

In der männlichen Niere zeigte sich auch unter Se-Mangel eine höhere SePP mRNA Konzentration trotz signifikant geringerer renaler Se-Konzentration in den Männchen im Vergleich zu den Weibchen. Der SePP Geschlechtsdimorphismus in der Niere scheint unabhängig vom Se-Status der Maus zu sein.

Die GPx3 Aktivität im Serum der 35 Tage alten C57Bl/6 Mäuse sank unter Se-Mangel. Ebenso wiesen männliche und weibliche Nieren geringere renale Se-Konzentrationen auf. Folglich spiegelte sich der reduzierte renale Se-Gehalt in einer verminderten GPx3 Synthese und sinkenden GPx3 Serum Aktivitäten wider. Dabei wirkte sich die stärkere Se-Reduktion in der männlichen Niere nicht auf die GPx3 Aktivitäten aus. Unter Se-Defizienz waren diese als auch die renalen GPx3 mRNA Konzentrationen in beiden Geschlechtern gleich, entgegen der höheren GPx3 Aktivität im Se-suffizienten versorgten Weibchen. Scheinbar reduziert sich unter einem Se-Mangel die GPx3 Proteinstabilität oder Translationseffizienz, durch z.B. bekannte Mechanismen wie einem verringerten SeCys Einbau in die wachsende Proteinkette, in einem stärkeren Maße in den Weibchen als in den Männchen [Moriarty et al. 1998(131); Sun et al. 2002(109); Weiss et al. 2001(128)].

Die GPx1 zeigte unter Se-Mangel unerwartet eine geschlechtsspezifische Expression, insbesondere in der Niere. Generell wurden die GPx Aktivitäten in Leber und Niere disproportional in Männchen und Weibchen reduziert. In der Leber erfolgte eine stärkere Aktivitätsabnahme in den Weibchen. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, bestärken aber unsere Vermutung einer effizienteren Selenoproteinbiosynthese in der männlichen Leber. In der Niere wurden signifikant niedrigere GPx und TrxR Aktivitäten in den Männchen gemessen. Die männliche Niere scheint auf einen Se-Mangel sensitiver als die weibliche zu reagieren. Bei gleicher Se-Bereitstellung über das Futter ist die renale Se-Bioverfügbarkeit und damit die Biosynthesekapazität in den Männchen geringer. Dies bedingt eine stärkere Reduktion der GPx und TrxR Aktivitäten in den Männchen. Möglicherweise ist aber die männliche Niere stärker auf die Se-Versorgung via hepatischem SePP angewiesen und generell sinkende SePP-Konzentrationen im Serum beider Geschlechter unter Se-Defizienz beeinflussen die renale TrxR und GPx Biosynthese stärker in den Männchen. Die hepatischen SePP mRNA Konzentrationen als auch die Serum Se-Werte zeigten keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Da gleiche renale GPx1 mRNA Konzentrationen in Weibchen und Männchen gemessen wurden, bedingt eine sinkende Translationseffizienz oder Proteinstabilität die verminderte männliche GPx Aktivität. Die geringere Se-Konzentration in der männlichen Niere deutet auf eine verminderte renale Se-Resorption der Männchen, welche infolge z.B. die Bereitstellung der Translations-Kofaktoren oder das Verhältnis der SeleocysteinyI-tRNA Isoformen zueinander negativ beeinflussen kann (siehe 1.6). Eine weitere Ursache für die Reduktion der GPx und TrxR Aktivitäten in der männlichen Niere unter Se-Mangel könnte der bevorzugte Einbau der reduzierten Se-Menge in lokal synthetisiertes SePP sein. Die unter Se-Suffizienz beobachtete höhere renale SePP mRNA Konzentration in den Männchen wurde durch eine geringere Se-Zufuhr nicht beeinflusst. Sowohl Se-Mangel als auch Se-Exzess können zu ansteigendem oxidativen Stress führen [Shalini et al. 2006(226)]. Eventuell nutzen Männchen und Weibchen unter Se-Mangel unterschiedliche gewebespezifische Systeme zum Abbau von oxidativem Stress, infolge einer ungleichen Belastung mit oxidativen Stressoren in beiden Geschlechtern. Eine geschlechtsspezifische Beteiligung von SePP an diesen Prozessen wäre denkbar, zumal dies ohne den Geschlechtsaspekt schon gezeigt werden konnte [Arteel et al. 1998(93); Saito et al. 2004(86); Takebe et al. 2002(92)]. Somit würde man vermuten, dass die männliche Niere weniger GPx1 und TrxR zugunsten von SePP produziert, die weibliche mehr TrxR und GPx1 zuungunsten der GPx3 Expression.

Stärkere renale aber schwächere hepatische geschlechtsspezifische Dio1 Expression unter Se-Mangel

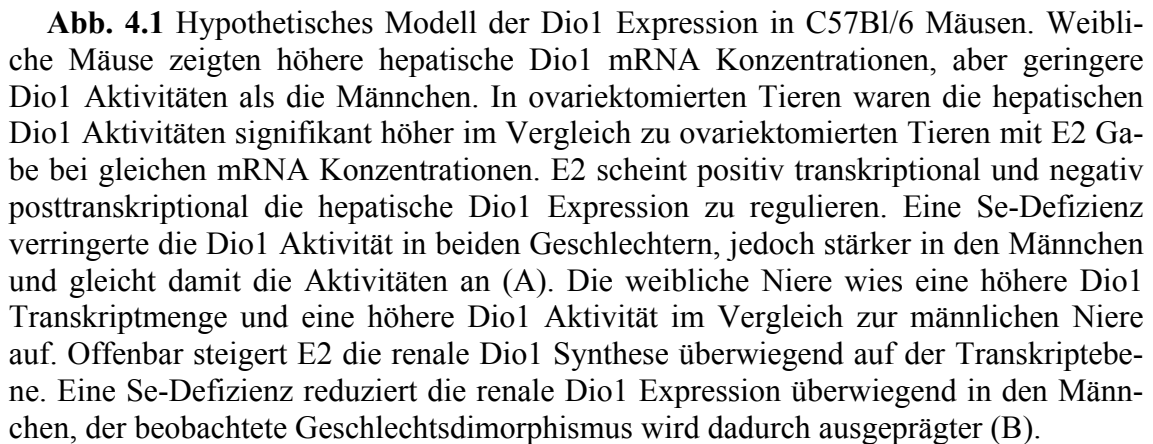
Die Dio1 ist ein Protein, dessen Expression unter Se-Mangel vom Gewebetyp abhängt. So zeigte sich in Niere und Leber von Nagern eine drastische Reduktion der Dio1 Aktivität auf 5% des Ausgangswertes in Kombination mit sinkenden Se-Konzentrationen (Leber), in der Schilddrüse dagegen blieb die Dio1 Aktivität und der Se-Gehalt unter Se-Defizienz konstant [Köhrle 2005(99)] bzw. stieg sogar an [Beech et al. 1995(189)]. Eine Reduktion der hepatischen Dio1 Aktivität beobachtete man auch bei den 35 Tage alten Se-Mangel Mäusen, wobei diese stärker in der männlichen Leber ausfiel. Infolgedessen glichen sich unter Se-Defizienz die hepatischen Dio1 Aktivitäten beider Geschlechter an. Die Dio1 mRNA Konzentration in der Leber war erneut höher in den Weibchen. Studien zeigten, dass sich unter Se-Defizienz die hepatische Dio1

Transkriptmenge nur geringfügig verändert, die Aktivität bzw. Proteinmenge aber infolge eines verringerten Selenocysteineinbaus sichtbar vermindert ist [DePalo et al. 1994(227)]. Auch unter Se-Mangel scheinen die Weibchen die hepatische Dio1 weniger effizient als die Männchen zu translatieren, denn aus höheren Transkriptmengen resultieren gleiche Aktivitäten. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass unter Se-Mangelbedingungen die vermuteten E2 Einflüsse bestehen bleiben, insbesondere der positive transkriptionelle Effekt (siehe 4.2). Der inhibierende posttranskriptionelle E2 Einfluss war nicht mehr so ausgeprägt (Abb. 4.1) bzw. wurde durch die stärkere Aktivitätsreduktion in der männlichen Leber nicht mehr sichtbar.

In der Niere war erneut die männliche Dio1 Expression extremer durch einen Se-Mangel betroffen, wie schon zuvor bei der GPx und TrxR Expression beobachtet wurde. Die männliche renale Dio1 Aktivität reduzierte sich stärker im Vergleich zur weiblichen. Damit steigerten sich die Geschlechtsunterschiede in der Dio1 Expression unter Se-Mangel. Dies wurde analog auch bei den renalen Dio1 mRNA Konzentrationen beobachtet, allerdings nicht so ausgeprägt. Jenes Phänomen ist aus der Literatur bekannt [DePalo et al. 1994(227)]. So scheint auch die renale Dio1 Aktivität in den Männchen, ergänzend zur TrxR und GPx Aktivität, unter Se-Mangelzuständen zugunsten anderer Selenoproteine, wie z.B. SePP, reduziert zu werden. Dies würde für eine Art Konkurrenz von Dio1 und SePP um die limitierende Menge der Selenocysteinyl-tRNA Substrate für eine effiziente Selenoprotein-Biosynthese, wie unter 4.2. erwähnt, sprechen.

Zusammenfassend bestätigen die Daten der 35 Tage alten Se-Mangelmäuse, dass Männchen und Weibchen organspezifisch unterschiedlich auf einen Se-Mangel reagieren. Unsere Vermutung einer effektiveren Selenoprotein-Expression in der weiblichen Niere bestätigte sich unter Se-Mangel durch eine stärker reduzierte Se-Konzentration als auch GPx, Dio1 sowie TrxR Aktivität in der männlichen Niere. Eine geringere hepatische GPx1 Aktivität in den Weibchen und analoge SePP Transkriptmengen in beiden Geschlechtern bei unzureichender Se-Zufuhr deuten auf eine höhere Effizienz in der Selenoproteinbiosynthese in der männlichen Leber.

B Regulation der renalen Dio1 Expression durch Sex und Se



Für folgende vergleichende Analyse wurden die C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-
Zufuhr im Alter von 35 Tagen, 60 Tagen und 1 Jahr hinzugezogen. Die erwähnten 60
Tage alten Mäuse sind die Wildtypiere, charakterisiert unter 2.2/Tab. 2C.

Die Serum Se-Spiegel der 35 Tage, 60 Tage und 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse waren im gleichen Wertebereich und keine Unterschiede wurden hinsichtlich des Geschlechts gemessen. Im Menschen stellte man einerseits keinen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Se-Spiegel fest [Swanson et al.1990(228)], andererseits konnte man einen Anstieg der Serum Se-Konzentration in alten Menschen [Lopes et al. 2004(194)] sowie eine inverse Korrelation zwischen Alter und Se-Spiegel ab dem 65. Lebensjahr

beobachten [Bates et al. 2002(229)]. Diese heterogene Datenlage lässt sich möglicherweise auf die Abhängigkeit der Serum Se-Spiegel von den jeweiligen individuellen Ernährungsgewohnheiten und auf eine regional bedingte ungleiche Se-Aufnahme in Bezug auf variierende Se-Bodengehalte zurückführen (siehe 4.2).

Die 1 Jahr alten Mäuse wiesen ebenfalls eine höhere SePP mRNA Konzentration in der weiblichen Leber auf, allerdings weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den 35 Tage alten Tieren. Diese geschlechtsspezifische hepatische SePP Expression war nicht in den 60 Tage alten Mäusen nachzuweisen. Möglicherweise ist dies auf die minimal höhere Se-Aufnahme über das Futter zurückzuführen, die die Ausprägung der Geschlechtsunterschiede in den 60 Tage alten Tieren verminderte. Der Se-Futtergehalt der 60 Tage alten Mäuse betrug 0,32 ppm im Vergleich zu 0,24 ppm bei den 35 Tage und 1 Jahr alten Tieren. Die hepatische geschlechtsspezifische SePP Expression, insbesondere der Weibchen, scheint stärker von der Se-Bioverfügbarkeit abhängig zu sein (siehe 4.3). Das Alter scheint dabei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, was humane Studien untermauern. Im Menschen zeigte man für das weibliche Geschlecht konstante Serum SePP Spiegel mit zunehmendem Alter [Ducros et al. 2000(183)].

Die Niere zeigte signifikant einheitlich eine höhere mRNA Konzentration von SePP in den Männchen der drei Altersgruppen. Der transkriptionelle Einfluss männlicher Geschlechtshormone auf die renale SePP Expression scheint unabhängig vom Alter zu sein. Sowohl in Leber als auch in Niere scheint die geschlechtsspezifische SePP Expression nicht allzu stark vom Alter abhängig zu sein, da annähernd gleiche Expressionsmuster in Mäusen unterschiedlichen Alters beobachtet wurden.

Altersabhängige geschlechtsspezifische Expression der GPx3 und GPx1

Eine größere Rolle spielte das Alter bei der geschlechtsspezifischen GPx3 und GPx1 Expression. Die höhere GPx3 Aktivität im Serum der weiblichen 35 Tage alten C57Bl/6 Mäuse wurde nicht bei den 60 Tage und 1 Jahr alten Weibchen festgestellt. Ein Vergleich der Serum GPx3 Aktivitäten zeigte annähernd gleiche Werte in den 35 und 60 Tage alten Tieren, jedoch zweifach verminderte GPx3 Aktivitäten in den 1 Jahr alten Mäusen. Die Vermutung liegt nahe, dass eine altersabhängige abnehmende Syntheseleistung der Niere die Reduktion der Serum GPx3 Aktivität bedingt. In Patienten mit chronischem Nierenversagen konnte gezeigt werden, dass die Serum GPx3 Aktivität

durch eine eingeschränkte renale Biosynthese signifikant vermindert wurde [Zachara et al. 2001(230); 2004(231)], jedoch diese Beobachtung nicht auf eine altersbedingte renale Funktionsbeeinträchtigung zurückgeführt werden kann [Wieczorowska-Tobis et al. 2001(232)].

In männlichen Fisher 344 Ratten stellte man ebenfalls eine Reduktion der Serum GPx3 Aktivität mit dem Alter fest, jedoch erst signifikant in 24 Monate alten Tieren [Tian et al. 1998(233)]. 80-jährige Männer wiesen ebenfalls reduzierte Serum Aktivitäten dieses Enzyms auf [Congy et al. 1995(234); Guemouri et al. 1991(162)]. Der Geschlechtsaspekt wurde bei dieser Studie bedauerlicherweise nicht beachtet. Eine Korrelation der Plasma GPx3 Aktivität mit dem Östrogenspiegel und eine reduzierte Östrogensynthese in postmenopausalen Frauen lässt ebenfalls eine vermehrte Abnahme der GPx3 Aktivität mit dem Alter im weiblichen Geschlecht im Menschen annehmen [Ha et al. 2003(165)].

Die Abnahme der GPx3 Aktivität mit dem Alter scheint in den Weibchen stärker und früher abzulaufen als in den Männchen. Demnach sind die Geschlechtsunterschiede schon in den 60 Tage alten Mäusen nicht mehr festzustellen. Offenbar sinkt der positive posttranskriptionelle E2 Einfluss auf die GPx3 Expression in alten Weibchen.

Ursächlich wäre eine veränderte Reaktion des Organismus auf eine Belastung mit oxidativen Stressoren im Alter denkbar, kombiniert mit einer stärkeren Abnahme der GPx3 Stressempfindlichkeit mit zunehmendem Alter in den Weibchen. Eine Abhängigkeit der GPx3 Expression von Umweltfaktoren wurde gezeigt [Bierl et al. 2004(209); Finley et al. 1991(75); Kim et al. 1999(76)]. So ließen sich keine signifikanten Geschlechtsunterschiede in den hepatischen und renalen MT II Transkriptmengen der alten Mäuse feststellen, was auf ähnliche Zustände oxidativen Stresses in Männchen und Weibchen deutet. Dies würde teilweise die gleichen GPx3 Aktivitäten beider Geschlechter in den 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen erklären.

Im Gegensatz zur gleichen GPx3 Expression in alten Weibchen und Männchen zeigte sich in den 1 Jahr alten Mäusen eine geschlechtsspezifische hepatische GPx1 Expression. Allgemein befanden sich die hepatischen und renalen GPx Aktivitäten der 35 Tage und 1 Jahr alten Mäuse in der gleichen Größenordnung, die der 60 Tage alten Tiere waren ca. 2-3-fach so hoch. Da die GPx1 Biosynthese stark von der Se-Bioverfügbarkeit abhängig ist [Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sunde et al. 1997(62)],

lässt sich dies auf die höhere Se-Zufuhr über das Futter zurückführen. Die 1 Jahr alten Mäuse zeigten eine höhere GPx1 mRNA Konzentration als auch Aktivität und TrxR Aktivität in der weiblichen Leber, korrelierend mit einer signifikant höheren hepatischen Se-Konzentration in den Weibchen. Dagegen wurde in der Niere mit zunehmendem Alter der Mäuse kein Geschlechtsunterschied in der GPx Expression beobachtet.

Es ist aus unseren Ergebnissen nicht genau abzuleiten, ob der Geschlechtsunterschied in der hepatischen GPx1 Expression mit dem Alter auf eine Reduktion der männlichen oder einem Anstieg der weiblichen GPx Expression zurückzuführen ist. Eine altersbedingte stärkere Zunahme der endogenen Lipidperoxidation in der weiblichen C57Bl/6 Mausleber, spricht für letztgenanntes [Rikans et al. 1997(235)], die ebenfalls beobachtete parallele Reduktion der hepatischen Dio1 in den alten Männchen für erstgenanntes. Die Daten der 35 Tage alten Se-suffizient und Se-mangelversorgten Mäuse deuten auf eine effizientere Selenoproteinbiosynthese der männlichen Leber. Anscheinend nimmt diese höhere Effizienz mit dem Alter im Männchen ab. Da die GPx Biosynthese stark von der Se-Kapazität abhängt, synthetisiert die weibliche Leber bedingt durch die möglicherweise effektivere hepatische Se-Resorption im Alter mehr GPx1. Weitere Studien in diesem Mausmodell bestätigen eine stärkere Abnahme der männlichen hepatischen zusätzlich auch renalen GPx Aktivität mit dem Alter, zeigen aber auch keine altersbedingten Veränderungen [Rikans et al. 1997(235)]. In CBA Mäusen wurde ebenso keine Assoziation zwischen der GPx1 Aktivität und dem Alter beobachtet [Muradian et al. 2002(236)]. Indes stellten andere Arbeiten, entgegen unseren Beobachtungen, deutlich einen stärkeren Anstieg der hepatischen GPx Aktivität in alten Männchen fest [Sverko et al. 2004(213)]. Interessanterweise korrelierte dies mit einer steigenden Inzidenz an Lebertumoren in diesen männlichen Tieren [Sverko et al. 2004(213)]. Auch in Ratten ist kein einheitliches Muster zwischen hepatischer und renaler GPx Aktivität, Geschlecht und Alter erkennbar [Rikans et al. 1997(235)]. Bei all diesen Studien wurde leider die Se-Zufuhr bzw. die Se-Gewebekonzentration nicht bestimmt bzw. angegeben. Somit sind Rückschlüsse der beobachteten geschlechtsspezifischen GPx1 Expressionen auf die Se-Zufuhr nicht direkt möglich.

Die Beispiele der GPx3 und GPx1 Expressionen verdeutlichen, dass Angaben zum Alter der Tiere und der Se-Zufuhr bei vergleichenden Studien in der Biosynthese von Selenoproteinen zwingend notwendig sind. Anscheinend wird die GPx3 Expression indirekt

über Parameter des oxidativen Stresses reguliert und die Sensitivität auf diese Stressoren scheint sich mit zunehmendem Alter geschlechtsspezifisch unterschiedlich stark zu verändern. Dagegen wird die GPx1 Expression stark durch die Se-Bioverfügbarkeit bestimmt und die Effizienz der Se-Aufnahme und damit die GPx1 Biosyntheseleistung reduziert sich mit dem Alter insbesondere in den Männchen.

Altersabhängige geschlechtsspezifische Dio1 Expression in der Leber, nicht aber in der Niere

Die renale Dio1 Expression zeigte in den 60 Tage und 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen das gleiche Muster wie in den 35 Tage alten Tieren. Die weibliche Niere wies eine höhere Dio1 mRNA Konzentration kombiniert mit einer höheren Dio1 Aktivität auf. Dagegen wurde in der 60 Tage alten Leber zwar erneut eine höhere Dio1 Aktivität in den Männchen gemessen, die hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen waren allerdings in beiden Geschlechtern gleich. Die Unterschiede in den hepatischen Dio1 Aktivitäten waren nicht mehr so stark ausgebildet, wobei dies durch eine Reduktion der männlichen Dio1 Aktivität um ca. 40% zustande kam. Interessanterweise wurden bei den 1 Jahr alten Tieren keine Geschlechtsunterschiede mehr auf Transkript- und Proteinebene festgestellt. Wiederum konnte dies auf eine weitere Reduktion der männlichen Dio1 Aktivität um 10% zurückgeführt werden. Die weibliche Dio1 Aktivität veränderte sich nur marginal mit dem Alter. Die Reduktion der Dio1 Aktivität mit zunehmendem Alter konnte ebenso in männlichen Ratten in der Leber als auch in der Schilddrüse nachgewiesen werden [Donda et al. 1989(237)]. Rosenthal und Kollegen zeigten hingegen eine verstärkte Reduktion der hepatischen Dio1 Aktivität mit zunehmendem Alter in weiblichen Ratten, wobei die Weibchen von vornherein schon höhere Aktivitäten aufwiesen [da Costa et al. 2001(170)]. Interessanterweise wurde in der Adenohypophyse von Ratten eine Zunahme der Dio1 Aktivität mit dem Alter beobachtet [Donda et al. 1989(237)], was erneut die gewebespezifische Veränderung der Dio1 Aktivität mit zunehmendem Alter verdeutlicht.

Die Reduktion der hepatischen Dio1 Aktivität ging parallel mit einer verringerten GPx1 Expression in den alten Männchen einher. Sowohl GPx1 als auch Dio1 in der Leber reagieren stark auf einen Se-Mangel mit einer verminderten Proteinmenge [Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sunde et al. 1997(62)]. Dies lässt vermuten, dass mit dem Alter die Effizienz der Se-Resorption bzw. des Selenocystein-Einbaus in der

männlichen Leber stärker als in der weiblichen Leber sinkt und sich infolge die hepatischen Dio1 Aktivitäten angleichen.

Ferner zeigten einige Studien, dass sich die Serum Schilddrüsenhormonspiegel im Alter reduzieren, insbesondere aber in den Männchen [da Costa et al. 2001(170)]. Andere Forscher gehen sogar von einer altersbezogenen Hypothyreose aus, dessen Ausmaß stärker in den Männchen zu beobachten ist [Cizza et al. 1996(238)]. Die somit veränderten T3 und T4 Spiegel im Alter könnten die Dio1 Expression geschlechtsspezifisch beeinflussen, wobei in der Literatur von einer Reduktion der Dio1 Expression bei Hypothyreose ausgegangen wird [Köhrle 2005(99)]. Die verminderte Dio1 Aktivität in den alten männlichen Mäusen würde dieser Beobachtung entsprechen.

Da die mRNA Konzentrationen zwischen Weibchen und Männchen im Alter gleich sind, scheint auch der positive transkriptionelle Einfluss von E2 in der Leber nachzulassen. Gleiche Dio1 mRNA Konzentrationen in männlicher und weiblicher Leber resultieren in gleichen Aktivitäten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die geschlechtsspezifische renale Dio1 Expression vom Alter der Mäuse unabhängig zu sein scheint. Auffallend ist, dass die Expression der Dio1 in der Niere analog zur renalen SePP Expression auf transkriptioneller Ebene durch Geschlechtshormone reguliert wird und die Biosynthesen beider renalen Selenoproteine nicht durch Parameter wie Alter und Se-Zufuhr beeinflusst werden. Dagegen findet die Regulation via Geschlechtssteroiden der hepatischen Dio1 und SePP Expression überwiegend auf der Ebene der Translation statt. Die Se-Zufuhr spielt dabei die entscheidende Rolle und Männchen können offenbar diese hepatischen Proteine effizienter synthetisieren, wobei diese höhere Effizienz mit dem Alter abnimmt.

4.5 Geschlechtseinfluss auf die Selenoproteinbiosynthese in Abhängigkeit vom Mausstamm

Der Vergleich der 90 Tage alten BALB/c Mäuse mit den 60 Tage alten C57Bl/6 Wildtypen zeigte, dass die geschlechtsspezifische Expression einiger Selenoproteine, wie der hepatischen und renalen GPx sowie der hepatischen Dio1, auch vom Mausstamm abhängt. Auffällig ist, dass dies insbesondere Selenoproteine sind, deren Biosynthese ebenfalls stark durch das Alter der Tiere und die Se-Zufuhr beeinflusst wird. Indes wie-

sen die geschlechtsspezifischen Biosynthesen von SePP und der renalen Dio1 keine Mausstammunterschiede auf.

Mausstammabhängige geschlechtsspezifische GPx, nicht aber SePP Expression

Die Serum Se-Spiegel als auch die Se-Konzentrationen in Leber und Niere der 90 Tage alten BALB/c Mäuse und der 60 Tage alten C57Bl/6 Tiere waren gleich. Ebenso zeigten sich in den BALB/c Lebern keine Geschlechtsunterschiede in den SePP mRNA Konzentrationen. Auch beobachtete man erneut eine signifikant höhere SePP Transkriptmenge in der männlichen Niere. Somit war die renale und hepatische SePP Expression der BALB/c Mäuse analog zum C57Bl/6 Mausstamm.

Interessanterweise beobachtete man eine unterschiedliche geschlechtsspezifische GPx3 Expression in beiden Stämmen. Wie bei den 60 Tage alten C57Bl/6 Mäusen waren die Serum GPx3 Aktivitäten in den BALB/c Mäusen beider Geschlechtern gleich. Indes zeigten die BALB/c Weibchen eine signifikant geringere GPx3 mRNA Konzentration in der Niere. Folglich scheinen die weiblichen Tiere effizienter GPx3 zu synthetisieren, denn aus niedrigeren weiblichen GPx3 Transkriptmengen resultieren gleiche Aktivitäten beider Geschlechter. Diese höhere Translationseffizienz stellte man ebenfalls in den 35 Tage alten C57Bl/6 Mäusen fest, nicht aber in den 60 Tage alten Tieren. Studien an Sprague-Dawley Ratten zeigten die dritte Möglichkeit der GPx3 Expression, mit einer höheren GPx3 Aktivität im Serum der Männchen [Finley et al. 1991(75)].

Ausgeprägter beobachtete man die Unterschiede zwischen beiden Stämmen in der GPx1 Expression. Die BALB/c Mäuse wiesen im Gegensatz zu den C57Bl/6 Tieren einen deutlichen Geschlechtseinfluss auf die GPx1 Aktivitäten unter Se-suffizienter Fütterung auf. Die Männchen zeigten eine höhere hepatische und eine niedrigere renale GPx1 Aktivität im Vergleich zu den Weibchen. Die dazugehörigen mRNA Konzentrationen als auch die Se-Konzentrationen in Niere und Leber waren gleich in beiden Geschlechtern. Kombiniert mit der höheren renalen weiblichen Translationseffizienz in der GPx3 Expression, würde dies der Hypothese einer effizienteren Selenoproteinbiosynthese in der männlichen Leber und in der weiblichen Niere nicht widersprechen. Andere Studien lassen aber vermuten, dass man dies nicht für das Mausmodell verallgemeinern kann. Entgegen unseren Beobachtungen in den BALB/c Tieren, zeigen die unter 4.2 aufgeführten Literaturdaten gleiche GPx1 Expressionsmuster in CBA Mäusen, Wistar und

Sprague-Darwley Ratten, mit einer höheren hepatischen und niedrigeren renalen GPx1 Aktivität in Weibchen [Banos et al. 2005(214); Pinto et al. 1969(215); Sverko et al. 2004(213); Yamamoto et al. 2002(216)]. Indes war die GPx1 Expression in Kumin Mäusen analog zum C57Bl/6 Mausstamm [Wu et al. 2003(211)].

Die unterschiedliche GPx3 und GPx1 Expression in den verschiedenen Spezies als auch Mausstämmen lässt vermuten, dass einerseits der genetische Background der Tiere, andererseits unterschiedliche Experimentbedingungen eine Rolle in der geschlechtsspezifischen Biosynthese dieser Enzyme spielen. Beide Proteine sind am antioxidativen System beteiligt und werden durch oxidative Stressparameter als auch die Se-Bioverfügbarkeit reguliert. Anscheinend variieren diese Faktoren zwischen den einzelnen Studien und kombiniert mit einer genetisch bedingten unterschiedlichen Enzymausstattung der verschiedenen Spezies bzw. Stämme, bewirkt es die unterschiedliche geschlechtsspezifische GPx1 und GPx3 Expression.

Mausstammabhängige geschlechtsspezifische Dio1 Expression in der Leber, nicht aber in der Niere

Interessanterweise konnte man in den 90 Tage alten BALB/c Mäusen im Vergleich zu den 60 Tage alten C57Bl/6 Tieren die gleiche renale Dio1 Expression feststellen. In der Leber zeigte sich jedoch eine höhere Dio1 Aktivität in den Weibchen und nicht wie erwartet in den Männchen. Die hepatischen Dio1 mRNA Konzentrationen waren gleich in beiden Geschlechtern. Offenbar wirkt im BALB/c Mausstamm E2 positiv auf die hepatische Dio1 Translation, entgegen der Beobachtungen im C57Bl/6 Mausstamm. Allgemein fielen die Dio1 Aktivitäten im Vergleich zu den C57Bl/6 Mäusen geringer aus, was man möglicherweise auf eine stammesbedingte geringere Se-Resorption, damit Se-Bioverfügbarkeit zurückführen kann. Die Se-Zufuhr via Selenit über das Futter entsprach der Zufuhr der C57Bl/6 Mäuse.

Die Beobachtungen in den BALB/c Mäusen entsprechen den Ergebnissen von Rosenthal et al. in Dutch-Miranda Ratten [da Costa et al. 2001(170)]. Hingegen zeigten Wistar Ratten ähnliche Ergebnisse wie die 60 Tage alten C57Bl/6 Mäuse [Lisboa et al. 2001(140); Miyashita et al. 1995(169)]. Die geschlechtsspezifische Dio1 Expression in der Leber wird durch Parameter wie Stamm, Spezies, Alter und Se-Bioverfügbarkeit beeinflusst. Analog zu GPx1 und 3 scheinen die genetischen Voraussetzungen des Stammes, der Spezies als auch die experimentellen Randbedingungen, insbesondere

aber die Se-Zufuhr, entscheidend für die überwiegend posttranskriptionelle Regulation der hepatischen Dio1 und damit für die geschlechtsspezifische Expression zu sein. Die transkriptionelle Regulation der renalen Dio1 war gleich in beiden Mausstämmen, analog zur SePP Expression. Die Se-Versorgung und die Stammeszugehörigkeit scheinen damit in der Niere eine nur untergeordnete Rolle zu spielen.

4.6 Geschlechtsspezifische Selenoprotein-Expression im SePP-KO Mausmodell

Die Selenoprotein P Knock-out (SePP-KO) Maus [Hill et al. 2003(95); Schomburg et al. 2003(96)] zeigte einen charakteristischen Phänotyp in Kombination mit einem gestörten Se-Metabolismus bzw. veränderten gewebespezifischen Selenoproteinkonzentrationen (siehe 1.4.3.1). Interessanterweise betraf die Phänotypausprägung überwiegend die Männchen. 10-30% der homozygoten SePP-KO Tiere verstarben im Alter von 5 Wochen bei Se-defizienter Fütterung. Die in dieser Arbeit untersuchten SePP-KO Mäuse überlebten diese kritische Phase und wurden im Alter von 60 Tagen getötet. Diese Tiere zeigten nicht den charakteristischen Phänotyp mit epileptischen Anfällen, Koordinationsschwierigkeiten, Wachstumsstörungen und männlicher Infertilität. Die gut mit Se-versorgten 60 Tage alten SePP-KO Mäuse wiesen analoge Gewichte wie die Wildtypen (wt) und Heterozygoten (het) gleichen Geschlechts auf. Im Gegensatz zu den 5 Wochen alten SePP-KO Tieren erhielten diese Mäuse Futter mit einem sehr hohen Se-Gehalt (0,32 ppm). Ein Se-Gehalt im Futter zwischen 0,15-0,20 ppm verursacht die Ausbildung des charakteristischen Phänotyps in den 5 Wochen alten SePP-KO Mäusen. Vergleicht man die Se-Gewebekonzentrationen der 60 Tage alten mit den 5 Wochen alten SePP-KO Mäusen, stellt man ebenfalls eine drastische Reduktion der Serum Se-Spiegel vom wt- über den het- zum SePP-KO Tier fest, bedingt durch den verminderten SePP Anteil im Plasma. Die hepatischen und renalen Se-Konzentrationen im SePP-KO unterschieden sich nicht von denen im Wildtyp. Eine Se-Akkumulation in der Leber, resultierend in einer erhöhten hepatischen GPx Aktivität, wurde in den 60 Tage alten SePP-KO Mäusen nicht beobachtet [Abb. 1.7; Schomburg et al. 2003(96)]. Gleiche Se-Konzentrationen in der wt-, het- und SePP-KO Leber bedingten gleiche hepatische GPx Aktivitäten sowie Proteinmengen und GPx1 mRNA Konzentrationen in den 3 Genotypen. Ebenfalls wurden keine Unterschiede in der SePP Transkriptmenge zwischen den

Lebern von wt und het gemessen. Hepatisches SePP versorgt unter anderem die Niere und das Plasma mit Se [Schomburg et al. 2006(100)]. Die in den 5 Wochen alten SePP-KO Tieren beobachtete reduzierte renale GPx Aktivität wurde einzig in den 60 Tage alten SePP-KO Männchen im Vergleich zum wt-Männchen festgestellt. Allerdings wurde bei den Analysen der 5 Wochen alten SePP-KO Tiere der Geschlechtsaspekt nicht beachtet [Schomburg et al. 2006(100)]. Die GPx1 mRNA Konzentrationen waren in der männlichen SePP-KO und wt-Niere gleich. Offenbar ist die renale GPx1 Expression der Männchen stärker auf die Se-Versorgung via hepatischem SePP angewiesen als die weibliche Niere, wie schon zuvor bei den Se-mangelversorgten Mäusen vermutet (siehe 4.3). Dies bestätigt die Hypothese, dass die männliche Niere weniger effizient Selenoproteine translatiert und damit sensitiver auf einen Se-Mangel reagiert. Da die renalen Se-Konzentrationen in wt- und SePP-KO Tieren beider Geschlechter gleich waren, scheint in den 60 Tage alten männlichen SePP-KO Mäusen das Syntheseverhältnis renaler Selenoproteine zu ungunsten von GPx1 verschoben zu sein. Allerdings wurden keine Unterschiede in der GPx3 sowie der Dio1 Expression und den TrxR Aktivitäten zwischen wt- und SePP-KO Männchen festgestellt. In der Hierarchie der Selenoproteine unter Se-defizienten Bedingungen sind die GPx1 und die GPx3 weit unten angesiedelt, dienen dem Organismus als Se-Speicher. Eine Se-Abgabe unter Se-Defizienz scheint gleichermaßen bei beiden Enzymen zu reduzierten Proteinmengen insbesondere in Niere und Leber zu führen [Bermano et al. 1995(124); Lei et al. 1995(125); Sunde et al. 1997(62)]. Eventuell wird das vorhandene Se bevorzugt in die GPx3 Synthese geschleust, die damit unter SePP Defizienz in der männlichen SePP-KO Maus im Vergleich zum Wildtyp erhalten bleibt. Der charakteristische Phänotyp der 5 Wochen alten SePP-KO Mäuse wird vermutlich durch einen veränderten Se-Metabolismus in Gehirn (neurologischer Phänotyp) und/oder in der Schilddrüse (Wachstumsstörungen) hervorgerufen [Schomburg et al. 2003(96); 2006(100)]. Keine Veränderungen wurden zumindest in den Schilddrüsen der 60 Tage alten SePP-KO Tiere beobachtet. GPx und Dio1 Aktivitäten in der Schilddrüse sowie Parameter der Schilddrüsenachse, wie Serum TSH, T4 und T3 waren unverändert [Schomburg et al. 2006(100)]. Ferner konnte man keine Unterschiede in den hepatischen und renalen Dio Aktivitäten und mRNA Konzentrationen hinsichtlich des Genotyps gleichen Geschlechts messen. Untersuchungen zum Gehirn der 60 Tage alten

SePP-KO Tiere stehen noch aus. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass nur marginale Veränderungen in GPx und Se-Konzentrationen messbar sind, da ebenso der neurologische Phänotyp (epileptische Anfälle) bei den 60 Tage alten SePP-KO Tieren ausblieb. Gehirn und Schilddrüse scheinen über zusätzliche Mechanismen zu verfügen, welche eine Se-Versorgung unabhängig vom hepatischen SePP gewährleisten [Schomburg et al. 2006(100); Schweizer et al. 2005(98)], infolgedessen nur minimale Veränderungen in den Selenoproteinkonzentrationen dieser Organe auftreten. So verhinderte die überdurchschnittlich hohe Se-Zufuhr die Ausprägung des charakteristischen Phänotyps in den 60 Tage alten SePP-KO Tieren.

Bei den 5 Wochen alten SePP-KO-Mäusen zeigten insbesondere die Männchen den typischen Phänotyp. Es wurde angenommen, dass die SePP-KO Männchen im Vergleich zu den SePP-KO Weibchen stärkere Veränderungen im Se-Metabolismus bzw. in den gewebespezifischen Selenoproteinkonzentrationen aufweisen. Da die Phänotypausprägung bei den 60 Tage alten Mäusen durch die hohe Se-Zufuhr nicht auftrat, konnte man anhand der hier ermittelten Daten keine Rückschlüsse auf einen unterschiedlichen Se-Metabolismus zwischen SePP-KO Weibchen und SePP-KO Männchen ziehen. Allerdings ließ sich in der Niere signifikant eine Reduktion der GPx Aktivität im männlichen SePP-KO im Vergleich zum wt und het feststellen, diese Daten erwiesen sich jedoch als nicht signifikant zum weiblichen SePP-KO. Hepatische GPx und TrxR Aktivitäten wiesen analog zum wt keine Geschlechtsunterschiede auf. SePP-KO Leber und Niere beider Geschlechter zeigten die gleiche geschlechtsspezifische Dio1 Expression wie in den wt-Mäusen. Dabei verstärkte sich der hepatische Dio1 Geschlechtsunterschied durch eine höhere Dio1 Aktivität im SePP-KO Männchen verglichen zum wt. Da die Se-Konzentrationen der SePP-KO Lebern beider Geschlechter gleich waren, kann man dies nicht auf eine vermehrte hepatische Se-Akkumulation zurückführen, sondern eventuell erneut über eine effizientere Dio1 Biosynthese in der männlichen Leber begründen, was die Mauseanalysen zuvor schon andeuteten (siehe 4.3).

Die vorliegenden Ergebnisse der 60 Tage alten SePP-KO Tiere bestätigen erneut, dass SePP nicht für eine ausreichende Selenoproteinbiosynthese unter Se-suffizienten Bedingungen notwendig ist. SePP-KO Männchen und Weibchen zeigten nur marginale Unterschiede in ihren Selenoproteinbiosynthesen resultierend aus einer SePP Defizienz. Indes ist SePP unter Se-Defizienz für die gewebespezifische Selenoprotein-Expression unab-

dingbar. Dabei scheinen Männchen in der Niere und Weibchen in der Leber mit der Selenoprotein-Expression stärker auf einen SePP Verlust zu reagieren. Zukünftige Untersuchungen von Se-defizient versorgten männlichen und weiblichen SePP-KO Mäusen sind zur Klärung dieses Aspektes notwendig.

4.7 Resumée und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression einiger Selenoproteine nicht nur durch den Se-Status beeinflusst wird, sondern auch das Geschlecht eine entscheidende Rolle spielt. Insbesondere die Dio1, die GPx3 und die SePP Biosynthese werden unterschiedlich in Weibchen und Männchen reguliert. Die angeführten Ursachen und Mechanismen für die Regulation der geschlechtsspezifischen Selenoprotein-Expressionen sind teilweise noch spekulativ und bedürfen zukünftiger Studien, um in mechanistischer Hinsicht verifiziert zu werden.

Es zeigte sich unter Se-suffizienten Bedingungen eine effizientere SePP und Dio1 Biosynthese in der männlichen Leber, wobei die Expression dieser Selenoproteine überwiegend posttranskriptional durch Geschlechtshormone beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu scheint die weibliche Niere effizienter in ihrer Selenoproteinbiosynthese zu sein, unter Se-suffizienten Bedingungen insbesondere in der Dio1 und GPx3 Expression. Dies bestätigten auch die Daten aus den Se-Mangelmäusen mit einer stärkeren Reduktion der TrxR, GPx und Dio1 Aktivitäten in der männlichen Niere.

Ferner wurde insbesondere die Expression jener Selenoproteine, welche überwiegend posttranskriptional via Geschlechtshormone reguliert wurden (hepatische Dio1, SePP, GPx; renale GPx), auch stark durch die Se-Zufuhr, das Alter und den Mausstamm beeinflusst. Infolgedessen waren zuvor beobachtete Geschlechtsunterschiede nicht mehr feststellbar oder es wurden neue Geschlechtsdimorphismen sichtbar.

Der transkriptionelle Geschlechtseinfluss von Androgenen oder Östrogenen auf die renale SePP und Dio1 Expression war indes unabhängig von der Se-Zufuhr, dem Alter und dem Mausstamm.

Diese Untersuchungen wurden am Mausmodell durchgeführt. Analoge Daten existieren in der Ratte und erste Studien im Menschen zeigten ähnliche geschlechtsspezifische Dio1 Expressionen (Dr. B. Mentrup, unveröffentlichte Daten). Männliche Krebspatienten scheinen schwerwiegender durch den Se-Status beeinflusst zu werden. Männer mit

basal niedrigeren Se-Spiegeln zeigten eine erhöhte Ansprechbarkeit auf eine Se-Gabe sowie infolge eine verbesserte Krebsinzidenz und Mortalitätsrate [Duffield-Lillico et al. 2002(25); Kornitzer et al. 2004(156); Waters et al. 2004(157)]. Unsere Daten lassen vermuten, dass dies auf eine geschlechtsspezifische Selenoprotein-Expression bei ausreichender Se-Versorgung und insbesondere unter Se-defizienten Zuständen zurückzuführen ist. Ebenso zeigte eine Se-Gabe nur in Frauen signifikant einen protektiven Effekt bei der Strumabildung [Derumeaux et al. 2003(153)]. Unter Umständen spielt dabei die niedrigere Dio1 Aktivität in der weiblichen Leber als auch Schilddrüse eine entscheidende Rolle. Weitere Studien im Menschen unter geschlechtsspezifischen Aspekten und unter Berücksichtigung der supplementierten Se-Form sind zwingend notwendig, um diese Zusammenhänge zu analysieren. Zukünftig wären geschlechtsabhängige Se-Supplementationen für einen erfolgreichen therapeutischen oder präventiven Einsatz denkbar. Um eine ausreichende Se-Versorgung beider Geschlechter zu garantieren, ist auch eine geschlechtsspezifische Se-Bedarfempfehlung vorstellbar.

Zusammenfassung

Se ist ein essentielles Spurenelement, das seine biologische Aktivität als Selenocystein in den katalytischen Untereinheiten von Selenoproteinen entfaltet. Es wird als Supplement in der Prävention und Therapie einiger Volkskrankheiten wie Autoimmunerkrankungen und Krebs eingesetzt. Die verfügbaren Ergebnisse der klinischen Studien deuten auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit von Se. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit die Biosynthese von Selenoproteinen in männlichen und weiblichen Mäusen als Modellorganismus für höhere Säugetiere analysiert und verglichen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse belegen eindeutig, dass die mRNA Konzentrationen von Selenoprotein P, der 5'-Iodothyronin-Deiodase Typ 1 und der extrazellulären Glutathion-Peroxidase 3 geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen. Dieser Dimorphismus ist jedoch nicht konstant, sondern variiert von Gewebe zu Gewebe und zeigt überdies auch eine Abhängigkeit vom Se-Status der Tiere und dem untersuchten Mausstamm. Überraschenderweise korrelieren die resultierenden Proteinmengen nicht linear mit den Unterschieden der mRNA Konzentrationen. Besonders die 5'-Iodothyronin-Deiodase Typ 1 zeigt ausgeprägte Unterschiede in Leber und Niere, wobei sich die Geschlechtsdimorphismen auf mRNA- und Protein-Ebene unterschiedlich stark ausprägen und vom Se-Status beeinflusst werden.

Zusammengenommen zeigt diese Arbeit, dass die Expression von Selenoproteinen auf zwei Kontrollebenen geschlechtsspezifisch reguliert wird: über steroidabhängige Gentranskription werden unterschiedliche mRNA Konzentrationen abhängig vom Mausstamm, Alter und Se-Status in den Geweben exprimiert, und über noch nicht eindeutig identifizierte Mechanismen wird die Effektivität, mit der diese Transkripte in die entsprechenden Selenoproteine übersetzt werden, geschlechtsspezifisch kontrolliert. Diese Se-abhängige Regulation der Biosyntheserate, die vermutlich über eine veränderte Translationseffizienz erfolgt, stellt ein sehr überraschendes Ergebnis dar. Sollte es sich in menschlichen Proben bestätigen, so könnten diese Ergebnisse helfen, die geschlechtsspezifischen Befunde in den klinischen Supplementationsstudien zu verstehen und entsprechend abgestimmte Empfehlungen für eine unterschiedliche Supplementaton von Mann und Frau zu erarbeiten.

Summary

Selenium is an essential trace element and acts as Selenocystein in the catalytic entity of selenoproteins. It is currently in use as supplement in the prevention and therapy of a variety of diseases including autoimmune diseases and cancer. The epidemiological and clinical data indicate that the effectiveness of Se supplementations is sex-specific. Therefore, this thesis was initiated to analyse and compare the expression of selenoproteins in male and female mice as a suitable model organism for higher mammals.

The experimental data clearly indicate that selenoprotein P, type I 5' iodothyronine deiodinase and the secreted glutathione peroxidase 3 display sex-specific differences in mRNA concentrations. The sexual dimorphic expression patterns of these selenoproteins are not constant but depend on the tissue, the Se-status of the animals and the specific mouse strain analysed. Surprisingly, no direct correlation is observed when mRNA levels and expressed protein concentrations are compared. This becomes very obvious in the case of type I 5' iodothyronine deiodinase in liver and kidney. Both mRNA and protein levels differ between the sexes in a discordant and Se-dependent manner.

Taken together, this thesis indicates that selenoprotein expression is regulated in a sex-specific manner by two different mechanisms. First of all, steroid-dependent gene transcription gives rise to sexually dimorphic mRNA levels in the different tissues. Mouse strain, age and Se-status influence this process. Secondly, the sexes differ profoundly with respect to the efficiency of selenoprotein biosynthesis from a given number of transcripts. Presumably, this process involves Se-dependent translational control mechanisms that have not been described before. Under the assumption that these results can be verified with human samples, it is conceivable that this new mechanism might help to explain some of the enigmatic sex-specific effects observed in human supplementary studies and that sex-specific supplementation regimen need to be worked out in the long run.

Literaturverzeichnis

1. Kohrl, J., Brigelius-Flohe, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O., and Flohe, L. (2000) *Biol. Chem.* 381, 849-864.
2. Barceloux, D. G. (1999) *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 145-172.
3. Vernie, L. N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 738, 203-217.
4. Schwarz, K. and Foltz, C. M. (1999) *Nutrition* 15, 255.
5. Flohe, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. (1973) *FEBS Lett.* 32, 132-134.
6. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) *Science* 179, 588-590.
7. Rayman, M. P. (2000) *Lancet* 356, 233-241.
8. Neve, J. (2000) *Nutr. Rev.* 58, 363-369.
9. Thomson, A. M., Rogers, J. T., and Leedman, P. J. (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1139-1152.
10. Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2002) *Mol. Cell Biol.* 22, 3565-3576.
11. Deutsche Gesellschaft für Ernährung Bonn (2004) DGE-Beratungs-Standards .
12. Thomson, C. D. (2004) *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 391-402.
13. Yang, G. Q., Wang, S. Z., Zhou, R. H., and Sun, S. Z. (1983) *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 872-881.
14. Hansen, J. C. and Deguchi, Y. (1996) *Acta Vet. Scand.* 37, 19-30.
15. Vezina, D., Mauffette, F., Roberts, K. D., and Bleau, G. (1996) *Biol. Trace Elem. Res.* 53, 65-83.
16. Gartner, R., Albrich, W., and Angstwurm, M. W. (2001) *Biofactors* 14, 199-204.
17. Duntas, L. H., Mantzou, E., and Koutras, D. A. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* 148, 389-393.
18. Gartner, R., Gasnier, B. C., Dietrich, J. W., Krebs, B., and Angstwurm, M. W. (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 1687-1691.
19. Baum, M. K., Miguez-Burbano, M. J., Campa, A., and Shor-Posner, G. (2000) *J. Infect. Dis.* 182 Suppl 1, S69-S73.
20. Hasselmark, L., Malmgren, R., Zetterstrom, O., and Unge, G. (1993) *Allergy* 48, 30-36.
21. Peretz, A., Neve, J., Duchateau, J., and Famaey, J. P. (1992) *Br. J. Rheumatol.* 31, 281-282.
22. Clark, L. C. and Marshall, J. R. (2001) *Urology* 57, 185-187.
23. Hartman, T. J., Taylor, P. R., Alfthan, G., Fagerstrom, R., Virtamo, J., Mark, S. D., Virtanen, M., Barrett, M. J., and Albanes, D. (2002) *Cancer Causes Control* 13, 923-928.
24. Russo, M. W., Murray, S. C., Wurzelmann, J. I., Woosley, J. T., and Sandler, R. S. (1997) *Nutr. Cancer* 28, 125-129.
25. Duffield-Lillico, A. J., Reid, M. E., Turnbull, B. W., Combs, G. F., Jr., Slate, E. H., Fischbach, L. A., Marshall, J. R., and Clark, L. C. (2002) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 630-639.
26. Duffield-Lillico, A. J., Dalkin, B. L., Reid, M. E., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Jacobs, E. T., Marshall, J. R., and Clark, L. C. (2003) *BJU. Int.* 91, 608-612.
27. Reid, M. E., Duffield-Lillico, A. J., Garland, L., Turnbull, B. W., Clark, L. C., and Marshall, J. R. (2002) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 1285-1291.
28. Klein, E. A., Thompson, I. M., Lippman, S. M., Goodman, P. J., Albanes, D., Taylor, P. R., and Coltman, C. (2003) *Urol. Oncol.* 21, 59-65.

29. Hercberg, S., Preziosi, P., Briancon, S., Galan, P., Triol, I., Malvy, D., Roussel, A. M., and Favier, A. (1998) *Control Clin. Trials* 19, 336-351.
30. Clark, L. C. and Jacobs, E. T. (1998) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 847-848.
31. Wolfram, S. (1995) *Med. Klin. (Munich)* 90 Suppl 1, 1-5.
32. Combs, G. F., Jr. and Combs, S. B. (1984) *Annu. Rev. Nutr.* 4, 257-280.
33. Mihara, H., Kurihara, T., Watanabe, T., Yoshimura, T., and Esaki, N. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 6195-6200.
34. Tamura, T., Yamamoto, S., Takahata, M., Sakaguchi, H., Tanaka, H., Stadtman, T. C., and Inagaki, K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 16162-16167.
35. Hassoun, B. S., Palmer, I. S., and Dwivedi, C. (1995) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 90, 133-142.
36. Nahapetian, A. T., Janghorbani, M., and Young, V. R. (1983) *J. Nutr.* 113, 401-411.
37. Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., and Suzuki, K. T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15932-15936.
38. Schauder, P., Ollenschläger, G. (2006) *Ernährungsmedizin, Prävention und Therapie* 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag 153
39. Richardson, D. R. (2005) *Biochem. J.* 386, e5-e7.
40. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) *Science* 300, 1439-1443.
41. Schomburg, L., Schweizer, U., and Kohrle, J. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1988-1995.
42. Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., and Larsen, P. R. (2002) *Endocr. Rev.* 23, 38-89.
43. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., and Kohrle, J. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1143-1149.
44. Arthur, JR., Nicol, F., Beckett, GJ. (1990) *Biochem J.* 272(2), 537-540.
45. Kohrle, J. (2002) *Methods Enzymol.* 347, 125-167.
46. Leonard, J. L., Visser, T. J., and Leonard, D. M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 2600-2607.
47. Schmutzler, C., Brtko, J., Winzer, R., Jakobs, T. C., Meissner-Weigl, J., Simon, D., Goretzki, P. E., and Kohrle, J. (1998) *Int. J. Cancer* 76, 368-376.
48. Toyoda, N., Zavacki, A. M., Maia, A. L., Harney, J. W., and Larsen, P. R. (1995) *Mol. Cell Biol.* 15, 5100-5112.
49. Baur, A., Bauer, K., Jarry, H., and Kohrle, J. (1997) *Endocrinology* 138, 3242-3248.
50. Kohrle, J. (1999) *Mol. Cell Endocrinol.* 151, 103-119.
51. Schneider, M. J., Fiering, S. N., Thai, B., Wu, S. Y., St Germain, E., Parlow, A. F., St Germain, D. L., and Galton, V. A. (2006) *Endocrinology* 147, 580-589.
52. Streckfuss, F., Hamann, I., Schomburg, L., Michaelis, M., Sapin, R., Klein, M. O., Kohrle, J., and Schweizer, U. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 739-745.
53. Burmeister, L. A., Pachucki, J., and St Germain, D. L. (1997) *Endocrinology* 138, 5231-5237.
54. Kalsbeek, A., Buijs, R. M., van Schaik, R., Kaptein, E., Visser, T. J., Doulabi, B. Z., and Fliers, E. (2005) *Endocrinology* 146, 1418-1427.

55. Maia, A. L., Kim, B. W., Huang, S. A., Harney, J. W., and Larsen, P. R. (2005) *J. Clin. Invest* 115, 2524-2533.
56. Hernandez, A. (2005) *Thyroid* 15, 865-874.
57. Hernandez, A., Martinez, M. E., Fiering, S., Galton, V. A., and St Germain, D. (2006) *J. Clin. Invest* 116, 476-484.
58. Sinitsyna, O., Krysanova, Z., Ishchenko, A., Dikalova, A. E., Stolyarov, S., Kolosova, N., Vasunina, E., and Nevinsky, G. (2006) *J. Cell Mol. Med.* 10, 206-215.
59. Behne, D. and Wolters, W. (1983) *J. Nutr.* 113, 456-461.
60. Flohe, L. (1997) *Med. Klin. (Munich)* 92 Suppl 3, 5-7.
61. Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C. D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16644-16651.
62. Sunde, R. A., Thompson, B. M., Palm, M. D., Weiss, S. L., Thompson, K. M., and Evenson, J. K. (1997) *Biomed. Environ. Sci.* 10, 346-355.
63. Beck, M. A., Esworthy, R. S., Ho, Y. S., and Chu, F. F. (1998) *FASEB J.* 12, 1143-1149.
64. Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., Jr., and Lei, X. G. (1998) *J. Nutr.* 128, 1070-1076.
65. Esworthy, R. S., Swiderek, K. M., Ho, Y. S., and Chu, F. F. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1381, 213-226.
66. Chu, F. F., Doroshov, J. H., and Esworthy, R. S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.
67. Al Taie, O. H., Uceyler, N., Eubner, U., Jakob, F., Mork, H., Scheurlen, M., Brigelius-Flohe, R., Schottker, K., Abel, J., Thalheimer, A., Katzenberger, T., Illert, B., Melcher, R., and Kohrle, J. (2004) *Nutr. Cancer* 48, 6-14.
68. Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O. J., Meyerhof, W., and Brigelius-Flohe, R. (2001) *Free Radic. Res.* 35, 655-663.
69. Esworthy, R. S., Aranda, R., Martin, M. G., Doroshov, J. H., Binder, S. W., and Chu, F. F. (2001) *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 281, G848-G855.
70. Chu, F. F., Esworthy, R. S., and Doroshov, J. H. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1481-1495.
71. Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., and Cohen, H. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686.
72. Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R. H., Kerl, E. A., Takahashi, K., Palmer, I. S., and Cohen, H. J. (1994) *Am. J. Physiol* 266, C367-C375.
73. Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B., and Holmgren, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29382-29384.
74. Arthur, J. R. (2000) *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1825-1835.
75. Finley, J. W. and Kincaid, R. L. (1991) *Biol. Trace Elem. Res.* 29, 181-191.
76. Kim, K. K., Whitin, J. C., Sukhova, N. M., and Cohen, H. J. (1999) *Pediatr. Res.* 46, 715-721.
77. Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., and Ursini, F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1208, 211-221.
78. Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F., and Girotti, A. W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1045, 252-260.
79. Behne, D., Duk, M., and Elger, W. (1986) *J. Nutr.* 116, 1442-1447.

80. Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999) *Science* 285, 1393-1396.
81. Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Behne, D. (2001) *FASEB J.* 15, 1236-1238.
82. Read, R., Bellew, T., Yang, J. G., Hill, K. E., Palmer, I. S., and Burk, R. F. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17899-17905.
83. Yang, J. G., Morrison-Plummer, J., and Burk, R. F. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 13372-13375.
84. Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R., and Burk, R. F. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10050-10053.
85. Burk, R. F. and Hill, K. E. (1999) *Bioessays* 21, 231-237.
86. Saito, Y., Sato, N., Hirashima, M., Takebe, G., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2004) *Biochem. J.* 381, 841-846.
87. Hondal, R. J., Ma, S., Caprioli, R. M., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15823-15831.
88. Burk, R. F. and Hill, K. E. (2005) *Annu. Rev. Nutr.* 25, 215-235.
89. Mostert, V., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2003) *FEBS Lett.* 541, 85-88.
90. Motsenbocker, M. A. and Tappel, A. L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 719, 147-153.
91. Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., and Takahashi, K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2866-2871.
92. Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 41254-41258.
93. Arteel, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., and Sies, H. (1998) *Biol. Chem.* 379, 1201-1205.
94. Yoneda, S. and Suzuki, K. T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 7-11.
95. Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., and Burk, R. F. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 13640-13646.
96. Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohe, L., Sendtner, M., and Kohrle, J. (2003) *Biochem. J.* 370, 397-402.
97. Schweizer, U., Michaelis, M., Kohrle, J., and Schomburg, L. (2004) *Biochem. J.* 378, 21-26.
98. Schweizer, U., Streckfuss, F., Pelt, P., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., Kohrle, J., and Schomburg, L. (2005) *Biochem. J.* 386, 221-226.
99. Kohrle, J. (2005) *Thyroid* 15, 841-853.
100. Schomburg, L., Riese, C., Michaelis, M., Griebert, E., Klein, M. O., Sapin, R., Schweizer, U., and Kohrle, J. (2006) *Endocrinology* 147, 1306-1313.
101. Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (1999) *J. Biomed. Sci.* 6, 151-160.
102. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C., and Curran, T. (1992) *EMBO J.* 11, 3323-3335.
103. Gromer, S., Urig, S., and Becker, K. (2004) *Med. Res. Rev.* 24, 40-89.
104. Powis, G., Mustacich, D., and Coon, A. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* 29, 312-322.
105. Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S. G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A. K., Just, U., Sinowatz, F., Schmahl, W., Chien, K. R., Wurst, W., Bornkamm, G. W., and Brielmeier, M. (2004) *Mol. Cell Biol.* 24, 9414-9423.

106. Jakupoglu, C., Przemeck, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., de Angelis, M. H., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Brielmeier, M., and Conrad, M. (2005) *Mol. Cell Biol.* 25, 1980-1988.
107. Miranda-Vizuete, A., Dandimopoulos, A. E., and Spyrou, G. (2000) *Antioxid. Redox. Signal.* 2, 801-810.
108. Lee, S. R., Kim, J. R., Kwon, K. S., Yoon, H. W., Levine, R. L., Ginsburg, A., and Rhee, S. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4722-4734.
109. Sun, X. and Maquat, L. E. (2002) *Methods Enzymol.* 347, 49-57.
110. Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Abdullah, M. S., Lado-Abeal, J., Majed, F. A., Moeller, L. C., Boran, G., Schomburg, L., Weiss, R. E., and Refetoff, S. (2005) *Nat. Genet.* 37, 1247-1252.
111. Copeland, P. R. and Driscoll, D. M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25447-25454.
112. Low, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., and Berry, M. J. (2000) *EMBO J.* 19, 6882-6890.
113. Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P., and Krol, A. (2000) *EMBO J.* 19, 4796-4805.
114. Chavatte, L., Brown, B. A., and Driscoll, D. M. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 408-416.
115. Ge, K., Xue, A., Bai, J., and Wang, S. (1983) *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 401, 1-15.
116. Beck, M. A., Levander, O. A., and Handy, J. (2003) *J. Nutr.* 133, 1463S-1467S.
117. Zimmermann, M. B. and Kohrle, J. (2002) *Thyroid* 12, 867-878.
118. Thilly, C. H., Contempre, B., and Vanderpas, J. B. (1990) *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 145, 440-448.
119. Goyens, P., Golstein, J., Nsombola, B., Vis, H., and Dumont, J. E. (1987) *Acta Endocrinol. (Copenh)* 114, 497-502.
120. Allander, E. (1994) *Scand. J. Rheumatol. Suppl* 99, 1-36.
121. Sudre, P. and Mathieu, F. (2001) *Int. Orthop.* 25, 175-179.
122. Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., and Elger, W. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 966, 12-21.
123. Brigelius-Flohé R. (1999) *Free Radic Biol Med* 27(9-10), 951-965
124. Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R., and Hesketh, J. E. (1995) *Biochem. J.* 311 (Pt 2), 425-430.
125. Lei, X. G., Evenson, J. K., Thompson, K. M., and Sunde, R. A. (1995) *J. Nutr.* 125, 1438-1446.
126. Christensen, M. J. and Burgener, K. W. (1992) *J. Nutr.* 122, 1620-1626.
127. Xia, Y., Hill, K. E., Byrne, D. W., Xu, J., and Burk, R. F. (2005) *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 829-834.
128. Weiss, S. S. and Sunde, R. A. (2001) *Biochem. J.* 357, 851-858.
129. Angstwurm, M. W., Schopohl, J., and Gaertner, R. (2004) *Eur. J. Endocrinol.* 151, 47-54.
130. Fagegaltier, D., Lescure, A., Walczak, R., Carbon, P., and Krol, A. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 2679-2689.
131. Moriarty, P. M., Reddy, C. C., and Maquat, L. E. (1998) *Mol. Cell Biol.* 18, 2932-2939.
132. Grundner-Culemann, E., Martin, G. W., III, Harney, J. W., and Berry, M. J. (1999) *RNA.* 5, 625-635.

133. Korotkov, K. V., Novoselov, S. V., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2002) *Mol. Cell Biol.* 22, 1402-1411.
134. Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L., and Berry, M. J. (2000) *EMBO Rep.* 1, 158-163.
135. Jameson, R. R., Carlson, B. A., Butz, M., Esser, K., Hatfield, D. L., and Diamond, A. M. (2002) *J. Nutr.* 132, 1830-1835.
136. Fletcher, J. E., Copeland, P. R., and Driscoll, D. M. (2000) *RNA.* 6, 1573-1584.
137. Carlson, B. A., Xu, X. M., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 5542-5548.
138. Moustafa, M. E., Carlson, B. A., El Saadani, M. A., Kryukov, G. V., Sun, Q. A., Harney, J. W., Hill, K. E., Combs, G. F., Feigenbaum, L., Mansur, D. B., Burk, R. F., Berry, M. J., Diamond, A. M., Lee, B. J., Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2001) *Mol. Cell Biol.* 21, 3840-3852.
139. Warner, G. J., Berry, M. J., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Faust, J. R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 28110-28119.
140. Lisboa, P. C., Curty, F. H., Moreira, R. M., Oliveira, K. J., and Pazos-Moura, C. C. (2001) *Horm. Metab Res.* 33, 532-535.
141. Ogawa, Y., Nishikawa, M., Toyoda, N., Yonemoto, T., Gondou, A., and Inada, M. (1999) *Horm. Metab Res.* 31, 295-299.
142. Fairweather, D. and Rose, N. R. (2004) *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2005-2011.
143. Knudsen, N., Laurberg, P., Perrild, H., Bulow, I., Ovesen, L., and Jorgensen, T. (2002) *Thyroid* 12, 879-888.
144. Whitacre, C. C. (2001) *Nat. Immunol.* 2, 777-780.
145. Yu, C. Y. and Whitacre, C. C. (2004) *Trends Immunol.* 25, 694-699.
146. Barbesino, G., Tomer, Y., Concepcion, E. S., Davies, T. F., and Greenberg, D. A. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 3290-3295.
147. Kumar, H., Daykin, J., Holder, R., Watkinson, J. C., Sheppard, M. C., and Franklyn, J. A. (1999) *Thyroid* 9, 1105-1109.
148. Tomer, Y. and Davies, T. F. (2003) *Endocr. Rev.* 24, 694-717.
149. Paavonen, T. (1994) *Ann. Med.* 26, 255-258.
150. Kanda, N. and Tamaki, K. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 282-288.
151. Elsheikh, M., Wass, J. A., and Conway, G. S. (2001) *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 55, 223-226.
152. Ivarsson, S. A., Ericsson, U. B., Nilsson, K. O., Gustafsson, J., Hagenas, L., Hager, A., Moell, C., Tuvemo, T., Westphal, O., Albertsson-Wikland, K., and . (1995) *Acta Paediatr.* 84, 63-65.
153. Derumeaux, H., Valeix, P., Castetbon, K., Bensimon, M., Boutron-Ruault, M. C., Arnaud, J., and Hercberg, S. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* 148, 309-315.
154. Batariova, A., Cerna, M., Spevackova, V., Cejchanova, M., Benes, B., and Smid, J. (2005) *Sci. Total Environ.* 338, 183-188.
155. Galan, P., Viteri, F. E., Bertrais, S., Czernichow, S., Faure, H., Arnaud, J., Ruffieux, D., Chenal, S., Arnault, N., Favier, A., Roussel, A. M., and Hercberg, S. (2005) *Eur. J. Clin. Nutr.* 59, 1181-1190.
156. Kornitzer, M., Valente, F., De Bacquer, D., Neve, J., and De Backer, G. (2004) *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 98-104.
157. Waters, D. J., Chiang, E. C., Cooley, D. M., and Morris, J. S. (2004) *Mutat. Res.* 551, 91-107.

158. Hunter, D. J., Morris, J. S., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Speizer, F. E., and Willett, W. C. (1990) *JAMA* 264, 1128-1131.
159. van den Brandt, P. A., Zeegers, M. P., Bode, P., and Goldbohm, R. A. (2003) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 866-871.
160. Becker, N., Holzmeier, S. (2003) Krebsatlas, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html>
161. Rush, J. W. and Sandiford, S. D. (2003) *Clin. Biochem.* 36, 345-351.
162. Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., and Siest, G. (1991) *Clin. Chem.* 37, 1932-1937.
163. Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Picciolini, E., De, L., V, Bonifazi, M., and Bernabei, A. (2000) *J. Endocrinol.* 167, 447-452.
164. Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Muscettola, M., Longini, M., and Buonocore, G. (2002) *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 57, 663-667.
165. Ha, E. J. and Smith, A. M. (2003) *J. Am. Coll. Nutr.* 22, 43-51.
166. Munoz-Castaneda, J. R., Muntane, J., Munoz, M. C., Bujalance, I., Montilla, P., and Tunez, I. (2006) *Toxicol. Lett.* 160, 196-203.
167. Schwaab, V., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1998) *Mol. Reprod. Dev.* 51, 362-372.
168. Harris, A. R., Vagenakis, A. G., and Braverman, L. E. (1979) *Endocrinology* 104, 645-652.
169. Miyashita, K., Murakami, M., Iriuchijima, T., Takeuchi, T., and Mori, M. (1995) *Mol. Cell Endocrinol.* 115, 161-167.
170. da Costa, V. M., Moreira, D. G., and Rosenthal, D. (2001) *J. Endocrinol.* 171, 193-198.
171. Löffler, P. (1998) Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage Springer Verlag
172. Seyffert W. (1998) Lehrbuch der Genetik, 1. Auflage Gustav Fischer Verlag
173. Morishita, S., Niwa, K., Ichigo, S., Hori, M., Murase, T., Fujimoto, J., and Tamaya, T. (1995) *Cancer Lett.* 97, 225-231.
174. Tsuda, M., Iwai, M., Li, J. M., Li, H. S., Min, L. J., Ide, A., Okumura, M., Suzuki, J., Mogi, M., Suzuki, H., and Horiuchi, M. (2005) *Hypertension* 45, 545-551.
175. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
176. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
177. Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984) *Methods Enzymol.* 105, 114-121.
178. Ellman, G. L. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443-450.
179. Leonard, J. L. and Rosenberg, I. N. (1980) *Endocrinology* 107, 1376-1383.
180. Sheehan, T. M. and Gao, M. (1990) *Clin. Chem.* 36, 2124-2126.
181. Ernst, M., Schmid, C., and Froesch, E. R. (1989) *J. Steroid Biochem.* 33, 907-914.
182. Reeves, P. G. (1997) *J. Nutr.* 127, 838S-841S.
183. Ducros, V., Ferry, M., Faure, P., Belin, N., Renversez, J. C., Ruffieux, D., and Favier, A. (2000) *Clin. Chem.* 46, 731-733.
184. Lewin, M. H., Hume, R., Howie, A. F., Richard, K., Arthur, J. R., Nicol, F., Walker, S. W., and Beckett, G. J. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1526, 237-241.
185. Sinha, Y. N., Wickes, M. A., Salocks, C. B., and Vanderlaan, W. P. (1979) *Biol. Reprod.* 21, 473-481.

186. Parkening, T. A., Collins, T. J., and Smith, E. R. (1982) *Exp. Gerontol.* 17, 437-443.
187. Xu, M., Hill, J. W., and Levine, J. E. (2000) *Neuroendocrinology* 72, 263-271.
188. Saade, G., London, D. R., Lalloz, M. R., and Clayton, R. N. (1989) *J. Mol. Endocrinol.* 2, 213-224.
189. Beech, S. G., Walker, S. W., Beckett, G. J., Arthur, J. R., Nicol, F., and Lee, D. (1995) *Analyst* 120, 827-831.
190. Burk, R. F. (2002) *Nutr. Clin. Care* 5, 75-79.
191. Yeh, J. Y., Ou, B. R., Gu, Q. P., and Whanger, P. D. (1998) *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 119, 151-155.
192. Arnaud, J., Bertrais, S., Roussel, A. M., Arnault, N., Ruffieux, D., Favier, A., Berthelin, S., Estaquio, C., Galan, P., Czernichow, S., and Hercberg, S. (2006) *Br. J. Nutr.* 95, 313-320.
193. Kafai, M. R. and Ganji, V. (2003) *J. Trace Elem. Med. Biol.* 17, 13-18.
194. Lopes, P. A., Santos, M. C., Vicente, L., Rodrigues, M. O., Pavao, M. L., Neve, J., and Viegas-Crespo, A. M. (2004) *Biol. Trace Elem. Res.* 101, 1-17.
195. Cunradi, C. B., Moore, R., Killoran, M., and Ames, G. (2005) *Subst. Use. Misuse.* 40, 171-185.
196. Dengler, R., Rushton, L., Roberts, H. R., and Magowan, R. (1994) *Health Educ. Res.* 9, 285-296.
197. von Bothmer, M. I. and Fridlund, B. (2005) *Nurs. Health Sci.* 7, 107-118.
198. Hartfiel, W. and Bahnerts, N. (1988) *Biol. Trace Elem. Res.* 15, 1-12.
199. Nakamuro, K., Nakanishi, K., Okuno, T., Hasegawa, T., and Sayato, Y. (1997) *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 43, 182-189.
200. Schrauzer, G. N. (2001) *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 1-4.
201. Gao, Y., Liu, Y., Deng, G., and Wang, Z. (2004) *Biol. Trace Elem. Res.* 100, 105-115.
202. Simpson, E. R., Clyne, C., Speed, C., Rubin, G., and Bulun, S. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 949, 58-67.
203. Simpson, E. R., Misso, M., Hewitt, K. N., Hill, R. A., Boon, W. C., Jones, M. E., Kovacic, A., Zhou, J., and Clyne, C. D. (2005) *Endocr. Rev.* 26, 322-330.
204. Larsen, P. R. (2002), *Williams Textbook of Endocrinology*, 606.
205. Sato, M. and Kondoh, M. (2002) *Tohoku J. Exp. Med.* 196, 9-22.
206. Takahashi, Y., Hursting, S. D., Perkins, S. N., Wang, T. C., and Wang, T. T. (2006) *Mol. Carcinog.* 45, 18-25.
207. Akova, B., Surmen-Gur, E., Gur, H., Dirican, M., Sarandol, E., and Kucukoglu, S. (2001) *Eur. J. Appl. Physiol* 84, 141-147.
208. Murakoshi, M., Ikada, R., and Tagawa, M. (1999) *J. Toxicol. Sci.* 24, 415-420.
209. Bierl, C., Voetsch, B., Jin, R. C., Handy, D. E., and Loscalzo, J. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 26839-26845.
210. Papp, L. V., Lu, J., Striebel, F., Kennedy, D., Holmgren, A., and Khanna, K. K. (2006) *Mol. Cell Biol.* 26, 4895-4910.
211. Wu, A., Sun, X., Wan, F., and Liu, Y. (2003) *J. Appl. Physiol* 94, 947-952.
212. Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Balog, T., and Marotti, T. (2006) *Biogerontology.* 7, 53-62.
213. Sverko, V., Sobocanec, S., Balog, T., and Marotti, T. (2004) *Biogerontology.* 5, 235-242.

214. Banos, G., Medina-Campos, O. N., Maldonado, P. D., Zamora, J., Perez, I., Pavon, N., and Pedraza-Chaverri, J. (2005) *Clin. Exp. Hypertens.* 27, 45-57.
215. Pinto, R. E. and Bartley, W. (1969) *Biochem. J.* 112, 109-115.
216. Yamamoto, T., Ohkuwa, T., Itoh, H., Sato, Y., and Naoi, M. (2002) *Comp Biochem. Physiol C Toxicol. Pharmacol.* 132, 437-444.
217. Merante, F., Altamentova, S. M., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Thatcher, B. J., Martin, B. M., Marshall, J. G., Tumiat, L. C., Cowan, D. B., and Li, R. K. (2002) *Mol. Cell Biochem.* 229, 73-83.
218. Santini, F., Hurd, R. E., Lee, B., and Chopra, I. J. (1994) *Metabolism* 43, 793-797.
219. Bianco, A. C. and Larsen, P. R. (2005) *Thyroid* 15, 777-786.
220. Herbert, S. (2006) Charakterisierung hormonregulatorischer Effekte von gonadalen Steroiden, TGF β 1 und GH auf die Promotor- und Enzymaktivität der humanen 5'-Deiodase Typ I in humanen HepG2 Zellen, Universität Würzburg
221. O'Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I. J., Baehr, W., Palczewski, K., and Blaner, W. S. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 35647-35657.
222. Burk, R. F. and Hill, K. E. (1994) *J. Nutr.* 124, 1891-1897.
223. Lee, W. S., Berry, M. J., Hediger, M. A., and Larsen, P. R. (1993) *Endocrinology* 132, 2136-2140.
224. Kohrle, J., Schomburg, L., Drescher, S., Fekete, E., and Bauer, K. (1995) *Mol. Cell Endocrinol.* 108, 17-21.
225. Sabatino, L., Iervasi, G., Ferrazzi, P., Francesconi, D., and Chopra, I. J. (2000) *Life Sci.* 68, 191-202.
226. Shalini, S. and Bansal, M. P. (2006) *Biometals* 20, 49-59.
227. DePalo, D., Kinlaw, W. B., Zhao, C., Engelberg-Kulka, H., and St Germain, D. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 16223-16228.
228. Swanson, C. A., Longnecker, M. P., Veillon, C., Howe, M., Levander, O. A., Taylor, P. R., McAdam, P. A., Brown, C. C., Stampfer, M. J., and Willett, W. C. (1990) *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 858-862.
229. Bates, C. J., Thane, C. W., Prentice, A., and Delves, H. T. (2002) *J. Trace Elem. Med. Biol.* 16, 1-8.
230. Zachara, B. A., Adamowicz, A., Trafikowska, U., Trafikowska, A., Manitijs, J., and Nartowicz, E. (2001) *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15, 201-208.
231. Zachara, B. A., Salak, A., Koterska, D., Manitijs, J., and Wasowicz, W. (2004) *J. Trace Elem. Med. Biol.* 17, 291-299.
232. Wieczorowska-Tobis, K., Wisniewska, J., Korybalska, K., Polubinska, A., Breborowicz, A., and Oreopoulos, D. G. (2001) *Int. Urol. Nephrol.* 32, 463-467.
233. Tian, L., Cai, Q., and Wei, H. (1998) *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1477-1484.
234. Congy, F., Bonnefont-Rousselot, D., Dever, S., Delattre, J., and Emerit, J. (1995) *Presse Med.* 24, 1115-1118.
235. Rikans, L. E. and Hornbrook, K. R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1362, 116-127.
236. Muradian, K. K., Utko, N. A., Fraifeld, V., Mozzhukhina, T. G., Pishel, I. N., and Litoshenko, A. Y. (2002) *Arch. Gerontol. Geriatr.* 35, 205-214.
237. Donda, A. and Lemarchand-Beraud, T. (1989) *Endocrinology* 124, 1305-1309.
238. Cizza, G., Brady, L. S., Esclapes, M. E., Blackman, M. R., Gold, P. W., and Chrousos, G. P. (1996) *Neuroendocrinology* 64, 440-448.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	GPH	Glykoproteinhormon, alpha-UE
Abb	Abbildung	kDa	Kilodalton
Ak	Antikörper	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogen- phosphat
APS	Ammoniumperoxo-disulfat	kas	kastriert
bp	Basenpaar	K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogen- phosphat
BSA	bovines Serum Albumin	Ka	Säurekonstante
Bq	Becquerel (1 Zerfall pro s)	KO	Knock-out
cAMP	cyclisches Adenosin- Monophosphat	GPx	Glutathion-Peroxidase
cDNA	complementary DNA	GR	Glutathion-Reduktase
CH ₃ COONa	Natriumacetat	GSH	Glutathion
(CH ₃) ₂ Se	Dimethylselenid	GSSG	Glutathiondisulfid
(CH ₃) ₃ Se ⁺	Trimethylselenonium Ion	h	Stunde
Ci	Curie (37 GBq; 3,7 x 10 ¹⁰ /s)	HCl	Salzsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	HClO ₄	Perchlorsäure
COS-7	Fibroblastenzellen der Niere	HEK 293	humane embryonale Nierenzellen
cpm	Counts pro Minute	HEPES	N-2-Hydroxyethyl- piperazine-N'-2- Ethansulfonsäure
CT	Threshold Cycle	HepG2	humane Leber-Karzinom- Zellen
d	Tag oder Durchmesser	het	heterozygotes Tier
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	His	Histidin
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HNO ₃	Salpetersäure
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung	H ₂ Se	Schwefelwasserstoff
DIFE	Deutsches Institut für Ernäh- rungsforschung	IGF	Insulin-like Growth Faktor
Dio	Iodothyronin-Deiodase	IgG	Immunoglobulin G
DMSO	Dimethylsulfoxid	IL	Interleukin
DTT	Dithiothreitol	INF gamma	Interferon gamma
E2	17-β-Estradiol	LH	Luteinisierendes Hormon
EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure	LiCL	Lithiumchlorid
EF _{SEC}	SeCys spezifischer Elongationsfaktor	m	Männchen
F-	Vorwärts	M	molar; mol/Liter
FCS	fetales Kälberserum	min	Minute
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon	Mops	3-(N-Morpholino)- Propansulfonsäure
FTC 133	humane follikuläre Schilddrüsenzelllinie	MT II	Metallothionin 2
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Na	Natrium
GH	Wachstumshormon	NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenosin- Dinukleotid-Phosphat
		NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogen-

	phosphat	SeMet	Selenomethionin
NaN ₃	Natriumazid	SePP	Selenoprotein P
NaOH	Natriumhydroxid	SePP-KO	Selenoprotein P Knock-out
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit		Maus
Na ₂ SeO ₄	Natriumselenat	sham	schein-operiert
mRNA	messenger RNA	SPS	Selenophosphat-Synthetase
ng	Nanogramm		
NMD	Nonsense-Mediated-Decay	T4	3,5,3',5'-Tetraiodo-Thyronin, Thyroxin
nM	nanomolar		
ovx	ovariektomiert	T3	3,3',5'-Triiodothyronin
ovx+E2	ovariektomiert+Estradiol	T	Dihydrotestosteron
p	p-Wert	Tab	Tabelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Taq	hitze stabile DNA Polymerase
PCR	Polymerase Kettenreaktion	TCA	Trichloressigsäure
pKa	negativer dekadischer Logarithmus von Ka	TmT	Methyltransferase
		TNF alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
pmol	picomol	Tris	Tris-hydroxymetyl)aminomethan
ppm	parts per million (10 ⁻⁶)		
PTU	6-n-Propyl-2-thiouracil	tRNA	transfer RNA
R-	Rückwärts	TrxR	Thioredoxin-Reduktase
RNA	Ribonukleinsäure	TSH	Thyroid Stimulating Hormon, Thyrotropin
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies		
rRNA	ribosomale RNA	U	unit
rT3	reverses T3 ; 3,3',5-Triiodothyronin	Ubq B	Ubiquitin B
		UE	Untereinheit
RT	Raumtemperatur	UTR	untranslatierter Bereich
RT-PCR	Realtime-PCR	UV	ultraviolett
s	Sekunde	ü.N.	über Nacht
SBP2	SECIS bindendes Protein 2	V	Volt
SD	Schilddrüse	w	Weibchen
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	wt	Wildtyp (Genotyp)
Se	Selen	µg	Mikrogramm
Sec	Selenocysteinrest	µl	Mikroliter
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz	ε	molarer Extinktionskoeffizient
SeCys	Selenocystein		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Veränderung der Sichtweise auf die biologische Funktion von Se in den letzten Dekaden	6
Abb. 1.2	Stoffwechsel der über die Nahrung aufgenommenen Se-Verbindungen	10
Abb. 1.3	Strukturformeln von Selenomethionin, Methionin, Selenocystein und Cystein bei physiologischem pH Wert.	11
Abb. 1.4	Metabolismus der Schilddrüsenhormone	12
Abb. 1.5	A) Verbindung des Glutathion-Redoxsystem mit dem Pentosephosphat zyklus B) Chemische Struktur des Tripeptids Glutathion	15
Abb. 1.6	Struktur des Selenoprotein P	18
Abb. 1.7	Se-Konzentrationen (A) und GPx Aktivitäten (B) in Wildtyp (+/+), Heterozygot (+/-) und SePP-KO Maus (-/-)	20
Abb. 1.8	Benötigte Komponenten für den Einbau von Selenocystein	21
Abb. 1.9	Zusammenfassende Darstellung des Se-Metabolismus auf molekularer Ebene.	22
Abb. 1.10	Schematische Darstellung der gewebespezifischen hierarischen Se-Ordnung	24
Abb. 1.11	Schematische Darstellung der 3 SECIS Formen	26
Abb. 1.12	Geschlechtsunterschiede in der Inzidenzrate (*Mortalitätsrate) weit verbreiteter Volkskrankheiten in der amerikanischen Bevölkerung 2001 (*2002)	29
Abb. 1.13	Die verschiedenen Krebsformen als Todesursachen	30
Abb. 3.1	Serum Se und GPx3 Aktivitäten der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung.	52
Abb. 3.2	Selenoprotein-Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit adäquater Se-Fütterung	53
Abb. 3.3	Dio1 Expression in Leber und Niere der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	55
Abb. 3.4	Tabellarischer Vergleich der Dio1 Aktivitäten mit den SePP mRNA Konzentrationen in den 35 d alten C57Bl/6 Mäusen mit suffizienter Se-Fütterung	56
Abb. 3.5	Dio1 Aktivitäten in Schilddrüse und Herz der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	57
Abb. 3.6	SePP mRNA und Se-Konzentrationen sowie GPx3 Aktivitäten der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse unter defizienter Se-Fütterung	58
Abb. 3.7	GPx-, TrxR-Aktivitäten und GPx mRNA Konzentrationen sowie Se-Konzentrationen in Niere und Leber der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se-Fütterung	59
Abb. 3.8	Hepatische Dio1 Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se- Fütterung	60
Abb. 3.9	Renale Dio1 Expression der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit defizienter Se-Fütterung	61
Abb. 3.10	Tabellarische Zusammenfassung der Dio1 Expression in Leber und Niere der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse	62
Abb. 3.11	Selenoprotein-Expression und Se-Konzentrationen in den 90 d alten BALB/c Mäusen mit suffizienter Se-Fütterung	64

Abb. 3.12	Hepatische Dio1 Expression der 90 d alten BALB/c Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	65
Abb. 3.13	Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 90 d alten BALB/c mit den 60 d alten C57Bl/6 Mäusen unter Se-suffizienter Fütterung	65
Abb. 3.14	Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 90 d alten BALB/c unter Se-suffizienter und Se-defizienter Fütterung	66
Abb. 3.15	Selenoprotein-Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	68
Abb. 3.16	Dio1 Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	69
Abb. 3.17	Tabellarischer Vergleich der Selenoprotein-Expression der 1 Jahr alten C57Bl/6 Mäusen mit den 60 d und 35 d alten C57Bl/6 Mäusen unter Se-suffizienter Fütterung	70
Abb. 3.18	Selenoprotein-Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	72
Abb. 3.19	GPx Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	73
Abb. 3.20	Dio1 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	74
Abb. 3.21	Dio1 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se- Fütterung	75
Abb. 3.22	Körpergewichte der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	76
Abb. 3.23	Se-Konzentrationen und GPx3 Expression der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	77
Abb. 3.24	SePP mRNA Konzentrationen in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	78
Abb. 3.25	GPx und TrxR Expression in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung.	79
Abb. 3.26	Dio1 Expression in Leber und Niere der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	80
Abb. 3.27	Dio1 und GPx Aktivitäten in der Schilddrüse der 60 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	81
Abb. 3.28	RT Ergebnisse einiger Translations-Kofaktoren der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse (A, B) und 60 d alten C57Bl/6 Mäuse (C) mit suffizienter Se-Fütterung	83
Abb. 3.29	Methyltransferase 1 (TmT 1) und Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) mRNA Konzentrationen der 35 d alten C57Bl/6 Mäuse mit suffizienter Se-Fütterung	84
Abb. 3.30	GPx Aktivitäten, SePP mRNA Konzentrationen und SePP Proteinmengen in HepG2 Zellen	86
Abb. 3.31	GPx Aktivitäten von COS-7 und FTC 133 Zellen nach Stimulation mit Dihydrotestosteron (T) und 17- β -Estradiol (E2)	87
Abb. 4.1	Hypothetisches Modell der Dio1 Expression in C57Bl/6 Mäusen.	106

Tabellenverzeichnis

TAB. 1	BENUTZTE LÖSUNGEN UND KITS	34
TAB. 2	CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN MAUSLINIEN DURCH MAUSSTAMM, ANZAHL DER WEIBLICHEN (♀) UND MÄNNLICHEN (♂) TIERE, TÖTUNGSALTER UND SE-GEHALT IM FUTTER	36
TAB. 3	VORWÄRTS (F) UND RÜCKWÄRTS (R) RT-PCR PRIMER	40
TAB. 4	GELZUSAMMENSETZUNGEN	46
TAB. 5	WESTERNBLOT - BEDINGUNGEN	47
TAB. 6	ZELLINIEN MIT KULTURBEDINGUNGEN	49

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

Cornelia Riese, Marten Michaelis, Birgit Mentrup, Franziska Götz, Josef Köhrle, Ulrich Schweizer and Lutz Schomburg (2006) Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*

Schomburg L, Riese C, Michaelis M, Griebert E, Klein MO, Sapin R, Schweizer U, Köhrle J (2005) Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology*

Petzke KJ, Riese C, Klaus S (2006) Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats. *J Nutr. Biochem.*

Kongressbeiträge

Riese C., Schweizer U., Köhrle J., Schomburg L.: Gender-specific differences in the expression of deiodinase I, 8th European Congress of Endocrinology. Glasgow, UK 2005

Riese C., Schweizer U., Köhrle J., Schomburg L.: Sex-specific differences in the expression of selenoproteins in mammals. Geschlechterforschung in der Medizin, GIM. Berlin 2005

Riese C., Schomburg L., Schweizer U., Köhrle J.: On the top priority of the thyroid gland for Se supply. 21. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF). Halle 2005

Riese C., Schweizer U., Köhrle J., Schomburg L.: Gender-specific differences in the expression of selenoproteins in mammals. 49. Symposium der DGE. Münster 2004

Riese C., Schweizer U., Köhrle J., Schomburg L.: Gender-specific differences in selenium biology: Possible cause for gender-bias in health and disease. Geschlechterforschung in der Medizin, GIM. Berlin 2004

Riese C.: Gender specific regulation of 5'-deiodinase type I in mice. 20. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF). Berlin 2004

Anhang

Lebenslauf

Geburtsdatum: 07.07. 1976
Wohnort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

07/2004 Doktorarbeit am Institut für Experimentelle
Endokrinologie, Charité Berlin

10/1999 - 05/2004 Studium der Ernährungswissenschaft an der
Universität Potsdam,
Diplomarbeit am Deutschen Institut für
Ernährungsforschung (DIFE)

09/1996 - 07/1999 Schering AG Berlin; Ausbildung zur
Chemielaborantin

09/1993 - 06/1996 Erwerb der Hochschulreife am Charles-Darwin
Gymnasium Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärtig nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Berlin, den 01.11.2006

Cornelia Riese

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehungsgeschichte dieser Arbeit mitwirkten.

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Josef Köhrle** für die Möglichkeit, diese interessante Thematik am Institut für Experimentelle Endokrinologie bearbeiten zu können und weiterhin für die Gelegenheit der Präsentation meiner Ergebnisse auf Kongressen im In- und Ausland.

Mein herzlicher Dank geht an meinen Betreuer **Dr. Lutz Schomburg**, der mit seinen Anregungen, der ständigen Diskussionsbereitschaft sowie dem allezeit offenen Ohr für alle Problemstellungen, diese Arbeit erst ermöglichte. Er gab mir weit mehr auf meinen zukünftigen Weg als nur Ratschläge und Tipps zum wissenschaftlichen Arbeiten!

Weiterhin danke ich Frau **Inka Hamann** für die Einweisung in den Deiodaseassay und die Realtime-PCR und die manchmal recht zeitintensive Auswertung. Dem Herrn **Peter Hofmann** gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur und bei allen Problemen, die im Zusammenhang mit dem Computer auftraten. Ebenso möchte ich mich bei **Dr. Ulrich Schweizer** und Herrn **Marten Michaelis** sowie den Tierpflegern für den reibungslosen Ablauf der Mäusezucht bedanken. Ein weiterer Dankesgruß geht an Frau **PD Dr. Franziska Götz** sowie Frau **Heide Lück** für die Hilfe bei der Gonadenentfernung und an Frau **Eva Wirth** für die Einweisung in das Multiplex Analyse System. Und ich möchte nicht vergessen mich bei **Silke Kappler** für die Mithilfe bei der Se-Bestimmung und bei **Anita Kinne, Antje Kunze, Katrin Huhne, Vartiter Seher, Rosemarie Großklaus** und **Dr. Birgit Mentrup** für die Unterstützung bei der allgemeinen Laborroutine zu bedanken.

Desweiteren werde ich die Abende nicht vergessen, an denen wir gemeinschaftlich in einer angenehmen humorvollen Atmosphäre, trotz Zeitdruck und langem Arbeitstag, Versuchstierexperimente beendeten. Und dafür gilt mein besonderer Dank vor allem **Kostja Renko, Inka Hamann, Peter Hofmann, Susanne Piehl, Marten Michaelis** und **Dr. Lutz Schomburg**.

Abschließend gebührt mein Dank meinem Freund **Steffen Maass** und meiner **Familie**, die mich in manch stressiger Stunde aushielten und gerade in der Endphase motivierend und aufbauend an meiner Seite standen!